

**A KÖRNYEZET KÖTÖTT NITROGÉN KONCENTRÁCIÓJÁNAK A  
BAKTERIÁLIS *SYRM* ÉS *NTRR* GÉNEK ÁLTAL KÖZVETÍTETT  
SZABÁLYOZÓ SZEREPE A SZIMBIOTIKUS NITROGÉNKÖTÉS EGYES  
SZAKASZAIBAN**

**PhD értekezés**

**Készítette:**

**Kissné Oláh Boglárka**

**MTA Szegedi Biológiai Központ**

**Genetikai Intézet**

**Témavezető:**

**Dr. Dusha Ilona**

**Szeged, 2000**

<b>TARTALOM</b>	oldal
<b>ELŐSZÓ</b>	4.
<b>1. BEVEZETÉS</b>	5.
1.1. A gümöstruktúra kialakulása	6.
1.2. A gümöinvázió	10.
1.3. Az <i>S. meliloti</i> EPSI termelése, és annak szabályozása	11.
1.4. A szimbiotikus nitrogénkötés	14.
1.5. A lucerna gümő szén és nitrogén metabolizmusa	16.
1.6. Kísérleti előzmények	19.
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b>	23.
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	25.
3.1. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok	25.
3.2. Mikrobiológiai eljárások	27.
3.3. Rekombináns DNS technikák	27.
3.4. $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitásának mérése baktérium kultúrából	28.
3.5. Alkalikus foszfatáz aktivitásának meghatározása baktérium kultúrából	28.
3.6. <i>S. meliloti</i> törzsek EPS termelésének vizsgálata	29.
3.7. EPSI izolálása, valamint kromatográfiás analízise	30.
3.8. Az EPSI frakciók hexóz komponensének meghatározása	30.
3.9. Szimbiotikus hatékonyság vizsgálata	31.
3.10. Növényi anyag előállítása génexpresszió vizsgálatokhoz	31.
3.11. RNS izolálás és RT-PCR kísérletek növényi anyagból	32.
3.12. Hibridizáció	33.
3.13. A <i>nifA-lacZ</i> és <i>nifH-lacZ</i> fúziók $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának mérése lucerna gümőben	33.
<b>4. EREDMÉNYEK</b>	35.
4.1. A <i>syrM</i> szerepe a <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 törzs EPS termelésében	35.
4.1.1. A vad típusú és <i>syrM</i> mutáns <i>S. meliloti</i> törzsek össz exopoliszacharid termelése	35.
4.1.2. Az <i>S. meliloti</i> 1021 törzs EPSI termelésének mennyisége, és a kétféle molekulatömegű forma eloszlásának aránya	37.
4.1.3. A <i>syrM</i> mutáció hatása az EPSI termelés mértékére, valamint a HMW és LMW formák arányára	39.
4.1.4. A kötött nitrogén hatása egyes <i>exo</i> gének kifejeződésére	41.
4.1.5. <i>exoP::phoA</i> , <i>exoK-lacZ</i> , illetve <i>exoH-lacZ</i> genomi fúziókat tartalmazó <i>syrM</i> mutáns <i>S. meliloti</i> törzsek előállítása	44.
4.1.6. Az <i>exoK</i> ill. <i>exoP</i> gének lehetséges szerepének vizsgálata a két EPSI forma (LMW-HMW) arányának kialakításában <i>syrM</i> mutáns háttérben	45.
4.2. A <i>Sinorhizobium meliloti</i> 399 törzs szimbiotikus hatékonyságának vizsgálata	53.
4.2.1. A <i>Sinorhizobium meliloti</i> 399 törzs szimbiotikus fenotípusa	53.
4.2.2. Az <i>ntrR</i> mutáció hatása a <i>nifA</i> és <i>nifH</i> gének kifejeződésére szimbiózisban	55.
4.2.3. Az <i>ntrR</i> mutáns baktériumok által indukált lucerna gümők nitrogén metabolizmusa	60.
4.2.4. Szén metabolizmus az <i>ntrR</i> mutáns baktériummal indukált gümőben	61.
<b>5. MEGVITATÁS</b>	64.
5.1. A <i>syrM</i> gén részt vesz az <i>S. meliloti</i> 1021 törzs EPSI termelésének mind a nitrogén, mind a luteolin általi szabályozásában	64.
5.1.1. Az exopoliszacharid szintézise, valamint egyes <i>exo</i> gének kifejeződése nitrogén kontrol alatt áll	64.
5.1.2. A kötött nitrogén koncentrációja befolyásolja a nagy (HMW) és kis (LMW) molekulatömegű EPSI formák arányát, amely folyamatban részt vesz a <i>syrM</i> gén is	65.
5.1.3. Nitrogén éheztetés mellett a <i>syrM</i> mutáció az <i>exoK</i> gén kifejeződésének emelkedéséhez vezet	66.

5.1.4. Az EPSI szintézist a luteolin is befolyásolja, feltehetően a <i>syrM</i> közreműködésével	69.
5.2. Az <i>ntrR</i> mutáns <i>S. meliloti</i> 399 törzs a vad típusú törzsnél hatékonyabb szimbiózist képes kialakítani a gazdanövénnel	70.
5.2.1. Az <i>S. meliloti</i> 399 törzs szimbiotikus fenotípusa növényi tesztben	70.
5.2.2. Az <i>ntrR</i> mutáció hatására megnő a bakteroid nitrogénkötési kapacitása	71.
5.2.3. Az <i>ntrR</i> mutáns megnövekedett nitrogénkötési kapacitásának hatása a gümő szén és nitrogén metabolizmusára	73.
5.2.4. Az <i>S. meliloti</i> 399 törzs előnyös szimbiotikus tulajdonságainak mezőgazdasági jelentősége	75.
6. ÖSSZEFOGLALÁS	77.
7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	79.
8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	86.
9. IRODALOMJEGYZÉK	88.

## ELŐSZÓ

A dolgozatban ismertetett kísérleti munka az MTA Szegedi Biológiai Központjának Genetikai Intézetében, a Nitrogénkötési Csoportban készült.

Köszönettel tartozom a Genetikai Intézet igazgatójának, Dr. Raskó Istvánnak, hogy munkámat lehetővé tette az általa vezetett intézetben, és a hároméves MTA fiatal kutatói ösztöndíjam után is támogatott abban, hogy munkámat be tudjam fejezni.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Dusha Ilonának, hogy munkámat figyelemmel kísérte, valamint köszönöm a dolgozat megírásával kapcsolatos hasznos tanácsait és bírálatait.

Köszönet dr. Borzi Miklósné asszisztensnek lelkiismeretes munkájáért, és a laboratóriumi módszerek elsajátításában nyújtott segítségéért.

Köszönet a Nitrogénkötési Csoport valamennyi tagjának, akik az évek során elméleti és gyakorlati tanácsaikkal segítették munkámat.

Köszönöm Tóth Sándornénak, valamint Dr. Kiss Ernőnek a dolgozat ábráinak elkészítésében nyújtott segítségét.

A dolgozat egy részének kísérleti anyaga a franciaországi Gif-sur-Yvette-ben található Institut des Sciences Végétales-ben (CNRS) készült. Köszönöm Dr. Kondorosi Ádámnak és Dr. Kondorosi Évának a lehetőséget, hogy ott működő csoportjaikban dolgozva elvégezhettem ezt a munkát, valamint bekapcsolódhattam az ott folyó számos más témába is, kibővítve ezzel mind szakmai, mind technikai tudásomat.

Szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, akik tanítottak, mindig mellettem álltak, és akikben mindig bízhattam. Külön is köszönöm mindkettőjüknek, hogy kisfiam születése után nagyon sokat segítettek abban, hogy a megnövekedett feladatok mellett is meg tudjam írni ezt a dolgozatot.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani férjemnek, Dr. Kiss Ernőnek, aki végtelen türelemmel kísérte végig ennek a dolgozatnak a születését, amely nem készülhetett volna el az ő biztatása nélkül.



## 1. BEVEZETÉS

A föld nitrogén készletének jelentős része gáz halmazállapotú, amelyet az élőlények túlnyomó többsége nem képes közvetlenül hasznosítani. A talaj alacsony nitrogéntartalmának más élőlény számára is felhasználható kötött formában való utánpótlására a légkörből csupán bizonyos prokarióta mikroorganizmusok képesek, amelyek a molekuláris nitrogént ammóniává redukálják, növelve a talaj hasznosítható nitrogéntartalmát. Ezek egy része szabadon élve (pl. *Klebsiella*), míg az *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Rhizobium* és *Sinorhizobium* fajok elsősorban a *Leguminosae* családba tartozó növényekkel szimbiózisban képesek a légköri nitrogén megkötésére (Allen és Allen 1981; Martinez-Romero és Caballero-Mellado, 1996).

A *Rhizobium*ok pillangós virágú növényekkel kialakított szimbiózisának, és ezen keresztül a légköri nitrogén biológiai úton történő hatékony megkötésének megismerése egyrészt elméleti szempontból rejt számos érdekességet (pl. a két, rendszertanilag igen távol álló szervezet közötti kommunikáció molekuláris mechanizmusának feltárása), másrészt gyakorlati szempontból is kiemelkedő jelentőségű.

A termőterületek intenzív mezőgazdasági tevékenység miatti nitrogénvesztését napjainkban műtrágyázással pótolják. Ez azonban csak rövidtávon nyújthat megoldást, hiszen ez a módszer igen költséges (egy tonna műtrágya előállításához 1,3 t kőolaj származék elégetéséből származó energia szükséges), és nagymértékben károsítja a környezetet. A talajból az élővizekbe mosódó nitrogén-sók tönkreteszik azok élővilágát, szennyezik az ivóvíz készleteket, és a tavak eutrofizációjához vezetnek. Ezzel ellentétben a biológiai nitrogénkötés teljesen környezetbarát, ugyanis a szimbiózist létesítő nitrogénkötő baktériumok képesek a növények teljes nitrogénszükségletének folyamatos ellátására, feleslegessé téve a műtrágyázást.

Ahhoz azonban, hogy a biológiai úton történő nitrogénellátást tetszés szerinti széles körben megvalósíthassuk, a természetes folyamat pontos megismerése szükséges. Így érthető, hogy a biológiai kutatások egy része a nitrogénkötés megismerésére, ezen belül a szimbiotikus nitrogénkötés fokozásának és kiterjesztésének lehetőségeire irányul. Az általunk vizsgált, modellként használt rendszer a *Sinorhizobium meliloti* és a lucerna ( *Medicago sativa* ) közt kialakuló szimbiózis.

### 1.1. A gümöstruktúra kialakulása

A szimbiózis kialakulása és fenntartása igen bonyolult folyamat, melynek alapfeltétele a két szimbionta génjeinek tér- és időbeni összehangolt működése, amelyet a baktérium és gazdanövénye közötti, jelmolekulák cseréjén alapuló kommunikáció biztosít.

A folyamat első lépéseként a növény gyökeréből a talajba kibocsátott különböző típusú vegyületek (szénhidrátok, aminosavak, flavonoidok) a szabadon élő *Rhizobium* fajok kemotaxisát váltják ki (Bergman és mtsai, 1988). A baktériumok a gyökér közelébe érve a fiatal gyökérszőrökhöz tapadnak, amely folyamat jelenlegi ismereteink szerint két lépésben megy végbe: először egy bakteriális  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjének, a ricadhezinnak a segítségével egy laza, nem gazdaspecifikus kapcsolat jön létre, melyet a baktériumok további felhalmozódása követ, mialatt a partnerek közötti kapcsolat szorosabbá válik bakteriális cellulóz fibrillumok, és növényi lektinek közreműködésével (Kijne és mtsai, 1992). A gyökérhez tapadt baktériumok a növekedésben lévő gyökérszőrök elágazását, pásztorbatszerű görbülését váltják ki, amivel egyidőben a gyökér kéregsejtjei osztódni kezdenek, és kialakul a gümömerisztéma, mely a fejlődő gümő szöveteinek létrehozásáért felelős (Dudley és mtsai, 1987). Az egymással

szimbiotikus kapcsolatot kialakítani képes fajok köre szigorúan meghatározott, azaz a folyamat gazdaspecifikus. Az úgynevezett széles gazdaspecifitású törzsek, mint például a *Rhizobium* sp. NGR234 sok növényt elfogadnak partnerként, míg más *Rhizobium*okra a szűk gazdaspecifitás jellemző, pl. a *Sinorhizobium meliloti* a *Medicago*, *Melilotus* és *Trigonella* fajokkal létesít szimbiózist.

A felismerés kezdeti lépéseiben kitüntetett szerepet játszó flavonoidoknak nem csak a baktériumok kemotaxisának kiváltásában, hanem gümőképzési, más néven nodulációs (*nod*) génjeiknek aktiválásában is szerepük van. A növények fajtól, fejlődési stádiumtól és a környezeti tényezőktől függően különböző összetételű flavonoid keveréket bocsátanak a talajba, melyek egyes komponensei serkentőleg, míg mások gátlólag hatnak a *Rhizobium*ok nodulációs génjeire (Györgypál és mtsai, 1988, 1991), így egyben a szimbiózis gazdaspecifitásának első meghatározói is.

A *nod* gének által kódolt fehérjék a növény számára válaszeljélül szolgáló lipokito-oligoszacharid típusú molekulák, a Nod-faktorok szintéziséért felelősek (Lerouge és mtsai, 1990). A minden *Rhizobium*ban megtalálható, erős konzerválódást mutató ún. közös *nod* gének a Nod-faktorok alapvázának szintézisében (*nodABC*) és transzportjában (*nodIJ*) résztvevő enzimeket határozzák meg. Az ún. gazdaspecifitási *nod* gének (*nodFELGHPQSXZ*) által kódolt fehérjék a Nod-faktorok szerkezetének az adott fajra jellemző módosítását végzik, különböző oldalcsoportokat kapcsolva az alapvázhoz (Schultze és mtsai, 1994; Dénarié és mtsai, 1996). A Nod-faktorok önmagukban is képesek kiváltani a gyökérsejtek plazmamembránjának depolarizációját, az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint oszcillációját (Erhardt és mtsai, 1992, 1996), az aktin filamentumok átrendeződését (Allen és mtsai, 1994), valamint a gyökérszőrök görbülését, és a gyökér kéregsejtjeinek osztódását (Lerouge és mtsai, 1990; Truchet és mtsai, 1991).

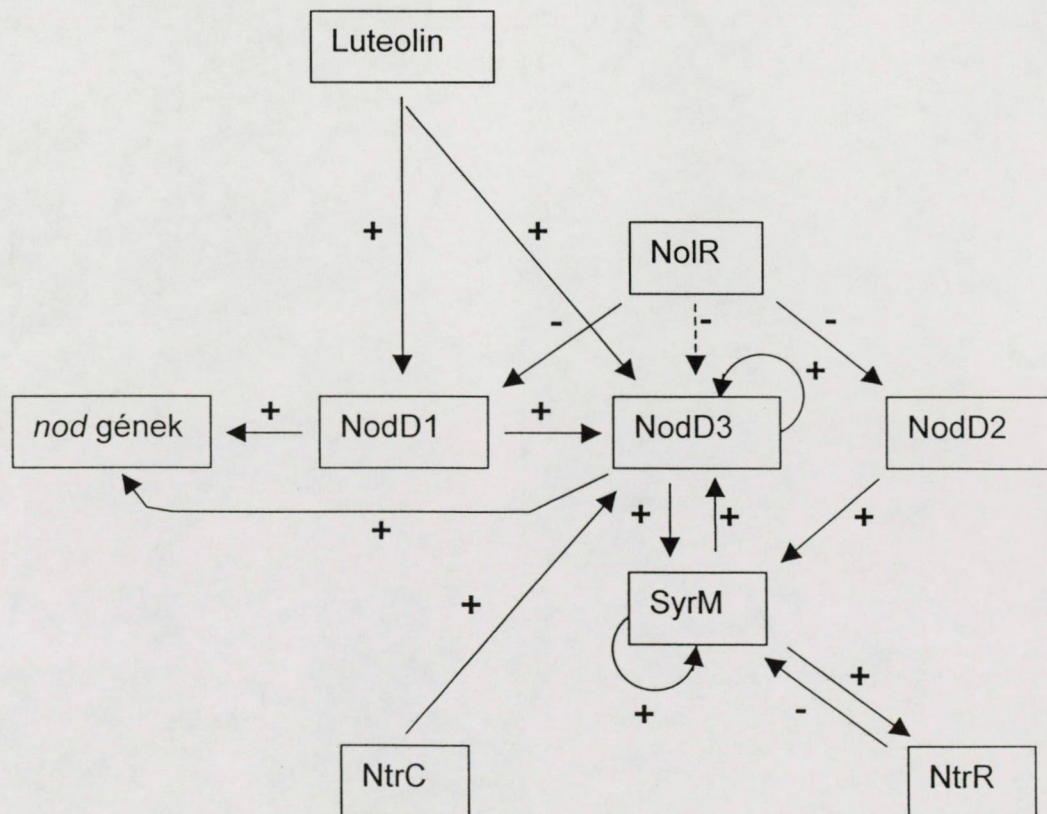


A *nod* gének indukciójáért a növény által kiválasztott flavonoidok, valamint az azokat érzékelő, fajtól függően 1-5 kópiában jelenlévő, transzkripciós aktivátor NodD fehérjéket kódoló gének felelősek. A NodD proteinek önmagukban is kötődnek az operonokba rendeződött *nod* gének promóter régiójában található, erősen konzerválódott cisz-regulátor DNS szakaszokhoz, az ún. *nod*-boxokhoz (Rostás és mtsai, 1986), de a *nod* gének transzkripciójának aktiválása csak a NodD fehérjével kölcsönhatásba lépő flavonoid jelenlétében történik meg (Mulligan és Long, 1985). A különböző *Rhizobium*ok NodD fehérjéinek flavonoid felismerése eltérő (Horváth és mtsai, 1987; Györgypál és mtsai, 1991), ami meghatározza, hogy az adott baktérium mely növényvel képes szimbiózist kialakítani.

A *nodD* gének bonyolult szabályozási rendszert alkotnak, melyben egyéb gének, pl. az *ntr* (központi nitrogén regulációs) rendszer egyes tagjai, valamint környezeti tényezők is részt vesznek. *S. meliloti*-ban három működő *nodD* kópia (Göttfert és mtsai, 1986; Honma és Ausubel, 1987), valamint a *nodD* homológ *syrM* (Mulligan és Long, 1989; Kondorosi és mtsai, 1991b) játszanak szerepet a *nod* gének aktiválásában (1. ábra).

Mind a *nodD1*, mind a *nodD2* gén konstitutívan, alacsony szinten fejeződik ki. A NodD1 fehérje, kölcsönhatásban az *S. meliloti* és *M. sativa* szimbiózisának kialakulásában legfontosabb flavonoiddal, a luteolinnal (Mulligan és Long, 1985), aktiválja a *nod* regulonok kifejeződését. A *nodD3* gén transzkripciója komplex szabályozás alatt áll. Expresszióját indukálja a SyrM (Mulligan és Long, 1989; Barnett és Long, 1990; Maillet és mtsai, 1990), a NodD1, és önmaga (Maillet és mtsai, 1990), valamint nitrogénmentes táptalajon a luteolin is (Dusha és mtsai, 1989). A noduláció a környezet nitrogén szintjének szabályozása alatt áll, melyben a *nodD3* központi szerepet játszik. Nitrogénéheztetés mellett az *ntr* rendszer tagja, az NtrC a *nodD3* promóteréhez

kötődve aktiválja azt, míg ammónia jelenlétében az NtrR fehérje fejt ki gátló hatását a *nodD3* génre, feltehetően a *syrM* génen keresztül (Dusha és mtsai, 1989; Dusha és Kondorosi, 1993). A *syrM* önmaga, a NodD2, és a NodD3 pozitív szabályozása alatt áll (Kondorosi és mtsai, 1991b; Swanson és mtsai, 1993). A SyrM ezen kívül indukálja az *ntrR* gén transzkripcióját is (Oláh és mtsai, 2000, beküldve). Az NtrR mellett a *nod* gének másik fontos represszora a NolR fehérje, amely a *nodD1* és *nodD2* gének kifejeződésének gátlásával szintén befolyásolja a termelődő Nod-faktor mennyiségét (Kondorosi és mtsai, 1991a). A Nod-faktorok hatására a gazdanövény fenil-propanoid bioszintézis útja aktiválódik (Savouré és mtsai, 1994), melynek eredményeképpen a *nod* gének aktiválásában részt vevő flavonoidok termelődnek (Dakora és mtsai, 1993). Valószínűsíthető, hogy ez a hatás a gümőzés pozitív szabályozó elemei közé tartozik, valamint részt vehet a szimbiózis kialakulásának későbbi folyamataiban is.



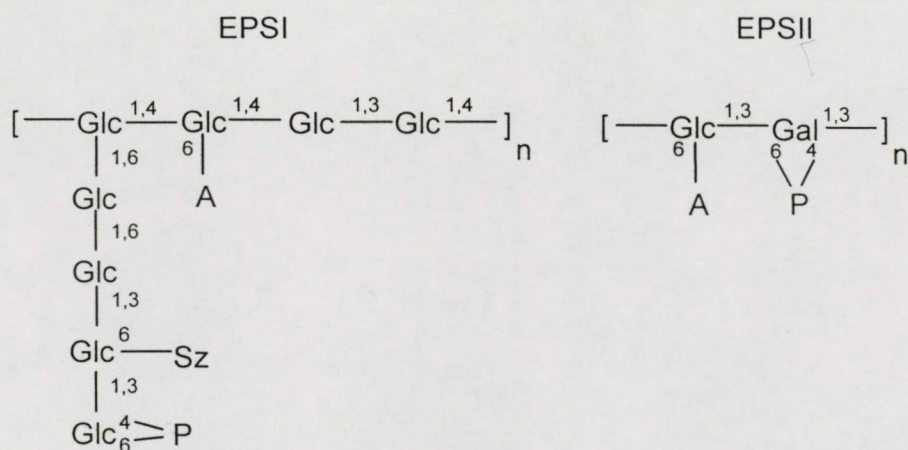
1. ábra A *nod* gének regulációja.



## 1.2. A gümőinvázió

A megtapadt baktériumok egy bizonyos ponton hidrolizálják a gyökérsejtek falát, majd a növényi sejtfal anyagokból álló, ún. infekciós fonálon keresztül behatolnak a gyökérbe (Brewin, 1991). A növekvő infekciós fonál keresztül halad a kéregsejteken a fejlődő gümőkezdemény felé, miközben szállítja a folyamatosan osztódó baktériumokat. Eközben a gümőkezdemény fokozatosan növekszik, és megkezdődik a gümő kialakulása. A baktériumok növényi membránnal körülvéve az infekciós fonálból a növényi sejtek citoplazmájába kerülnek, ahol átalakulnak a tényleges nitrogénkötést végző bakteroidokká.

A sikeres invázióhoz további bakteriális szignál molekulák szükségesek (Leigh és Coplin, 1992; Kannenberg, 1994). Ezek általában poliszacharid típusú vegyületek, mint pl. a savas exopoliszacharid (EPSI, vagy szukcinoglükán), melynek termelésében mutáns baktériumok üres gümőket indukálnak (Leigh és mtsai, 1985), ami annak a következménye, hogy az infekciós fonalak nem tudnak kifejlődni, így a baktériumok nem jutnak be a növényi szövetbe (Finan és mtsai, 1985; Leigh és mtsai, 1987).



2. ábra. A *S. meliloti* exopoliszacharidjainak alegységei. Glc=glükóz, Gal=galaktóz, A=acetil csoport, Sz=szukcinil csoport, P=piruvil csoport, 1,3=β-(1-3) glükózidos kötés, 1,6=β-(1-6) glükózidos kötés, az ábrán látható további számok a cukormolekulának azt a szénatomját jelölik, amelyhez a szubsztituens kapcsolódik.

### 1.3. Az *S. meliloti* EPSI termelése, és annak szabályozása

Az EPSI heteropoliszacharid, mely egy galaktózból és hét glükózból felépülő, acetil, piruvil, és szukcinil csoportokat hordozó oktamer alegység (2. ábra) polimerizációjával jön létre (Aman és mtsai, 1981). A termelő polimert a baktérium a környezetébe választja ki. Az EPSI termeléséért felelős géneket azonosították, szekvenciájukat meghatározták (Becker és mtsai, 1993a,b; Glucksmann és mtsai, 1993a; Müller és mtsai, 1993), és megvizsgálták szerepüket az EPSI szintézisben, módosításában, polimerizációjában, valamint transzportjában (Glucksmann és mtsai, 1993a,b; Reuber és Walker, 1993a) (3. ábra).

Az EPSI alegysége a baktérium belső membránjának citoszol felőli oldalán, egy lipid hordozón szintetizálódik. Az első molekulát, a galaktózt az ExoF fehérje kapcsolja a lipidhez. A további hét glükózt az ExoA,L,M,O,U,W és egy eddig ismeretlen fehérje kapcsolja a galaktózhoz. Bármelyik gén hiánya az EPSI képződés megszűnéséhez, ebből adódóan Fix<sup>-</sup> fenotípushoz vezet. A lánc módosításáért az ExoZ (acetil), ExoH (szukcinil) és az ExoV (piruvil) fehérjék felelősek. A szukcinil és piruvil modifikáció szükséges (Leigh és mtsai, 1987), míg az acetil csoport jelenléte nem lényeges a biológiai funkció betöltéséhez (Reuber és Walker, 1993b). Az oligomerek polimerizációját, valamint a polimerek transzportját a baktérium felszínére az *exoP*, *exoQ* és *exoT* gének által kódolt proteinek végzik.

Az EPSI egy nagy (HMW), és egy kis (LMW) molekulatömegű formára választható szét (Leigh és Lee, 1988). Az *exo* mutánsok Fix<sup>+</sup> fenotípusa, valamint gümőinváziós képessége részben helyreállítható tisztított LMW formával, míg a HMW frakciónak nincs hasonló hatása (Urzanqui és Walker, 1992; Battisti és mtsai, 1992), tehát a biológiailag aktív forma az LMW. A HMW és LMW formák aránya

meghatározott, melynek megőrzésére, valamint szükség szerinti megváltoztatására több mechanizmus létezik *S. meliloti*-ban. A polimerizációért és/vagy transzportért felelős mindhárom fehérje (ExoP,Q,T) részt vesz az LMW és HMW molekulák szintézisében (Becker és mtsai, 1995b; York és Walker, 1997), ezen kívül az ExoP feltehetően arányuk kialakításában is szerepet játszik (Becker és mtsai, 1995b). A HMW és LMW forma arányának kialakításáért valószínűleg az endoglükánázokat kódoló *exoK* (Glucksmann és mtsai, 1993a,b; Becker és mtsai, 1993) és *exsH* gének is felelősek (York és Walker, 1997, 1998), mivel a nagy molekulatömegű formát mono-, di- és trimerekké hasítják.

*S. meliloti*-ban az exopoliszacharidok szintézise mind transzkripció, mind poszttranszláció szinten szabályozott. A *mucR* (Keller és mtsai, 1995) és *expR* (Glazebrook és Walker, 1989) génekről kimutatták, hogy az EPSI és EPSII szintéziséért felelős *exo* és *exp* gének szabályozásában játszanak szerepet. A *mucR* és *expR* mutáns *S. meliloti* törzsek képesek egy másik exopoliszacharid, az EPSII termelésére is, mivel az EPSII egyébként gátolt szintézise indukálódik EPSI termelés hiányában. Az EPSII egy galaktózból és glükózból felépülő, acetil és piruvil módosításokat hordozó dimer polimerizációjával jön létre (2. ábra) (Glazebrook és Walker, 1989; Zhan és mtsai, 1989). Az EPSII LMW formája is képes helyreállítani az *exo* mutánsok inváziós képességét (Gonzalez és mtsai, 1996), amely alátámasztja azt az elképzelést, hogy az EPS molekulák nagyságának szerepe lehet a szignál specifikálásában.

Az *exoR* és *exoS* által kódolt fehérjék negatívan regulálják az *exo* gének kifejeződését. Az *exoR* és *exoS* gének mutációja megnövekedett EPSI termelést és ezzel mukoid fenotípust, valamint gümözesi defektust okoz (Reed és mtsai, 1991; Ozga és mtsai, 1994). A táptalaj magas ammónium szulfát tartalmának hatására bekövetkező EPSI szintézis gátlás közvetítésében is felmerült az ExoR regulációs szerepe.



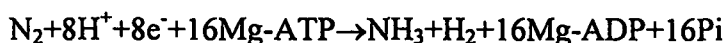


Későbbi kísérletekben azonban ki tudták mutatni az ammónia gátló hatását *exoR* mutánsban is, így az ExoR ammónia-érzékelő szerepe nem igazolódott be (Ozga és mtsai, 1994). Az *exoX-Y* páros az EPSI termelés poszttranszlációs szabályozásában vesz részt (Zhan és Lee, 1990).

#### 1.4. A szimbiotikus nitrogénkötés

A gyökérgümő a nitrogénkötéshez szükséges, speciális környezetet biztosít a mikroszimbionta számára. A bakteroidokat a növény citoplazmájában egy növényi sejtfal eredetű, ún. peribakteroid membrán (PBM) veszi körül, amely nem csak fizikailag választja el a bakteroidokat a növénytől, hanem fontos szerepet játszik a partnerek között kicserélődő anyagok transzportjának szabályozásában is (Udvardi és Day, 1997).

A nitrogén megkötését a bakteroid nitrogenáz enzimkomplexe végzi. A reakciót a következő egyenlet írja le:



A nitrogenáz enzim két fő komponensből, a *nifH* gén által kódolt homodimer Fe proteinből, valamint a MoFe kofaktort tartalmazó, *nifD* és *nifK* gének által kódolt tetramer molibdén-vas (MoFe) proteinből áll. A nitrogenáz működéséhez speciális, alacsony oxigénnyomású környezetet igényel, mivel a MoFe kofaktor irreverzibilisen denaturálódik O<sub>2</sub> jelenlétében (Shaw és Brill, 1977). Ez paradox helyzetet teremt, hiszen a nitrogénkötéshez szükséges nagy mennyiségű energia előállítása oxidatív folyamatokon keresztül valósul meg, amely sok oxigént igényel. A pillangósok gümőjének középső, ún. nitrogénfixálási zónájában a nitrogenáz működéséhez elengedhetetlen alacsony oxigén koncentráció a bakteroidok magas metabolikus

aktivitásának (nagy oxigénfogyasztás), valamint az oxigén gátként működő parenchima szövetnek köszönhetően alakul ki (Witty és mtsai, 1986). A fertőzött sejtekben a nagy oxigén affinitással rendelkező leghemoglobin molekula segíti elő az oxigén szállítását. Ily módon a baktérium alacsony oxigén koncentráció mellett is elegendő oxigénhez jut az energiaszükségletét kielégítő folyamatok számára.

*S. meliloti*-ban a *nif* gének kifejeződésének pozitív regulátora a NifA fehérje (Gussin és mtsai, 1986; David és mtsai, 1988). A NifA két szinten is oxigén szabályozás alatt áll: a NifA protein maga is oxigén érzékeny (Krey és mtsai, 1992), valamint a gén transzkripcióját is mikroaerob körülmények között indukálja a transzkripciós aktivátor FixJ (David és mtsai, 1988).

A FixJ egy két-komponensű szenzor/regulátor rendszer része, amelynek másik tagja az oxigén érzékelésre képes bakteriális transzmembrán protein, a FixL. Alacsony oxigénnyomás mellett a FixL foszforiláció útján aktiválja a FixJ-t (Agron és mtsai, 1993; Reyrat és mtsai, 1993), majd az aktivált FixJ indukálja a *nifA* transzkripcióját (Batut és mtsai, 1989).

Az oxigén elsődleges szabályozó szerepe mellett *S. meliloti*-ban felmerült a nitrogénkötés kötött nitrogén általi szabályozásának lehetősége is, elsősorban Noonan és mtsai (1992) kísérletei alapján, akik mikroaerob körülmények között nőtt baktérium kultúrákban kimutatták, hogy a *nifA* és a *nifH* gének kifejeződését az ammónia gátolja. Nem ismert azonban a gátlás mechanizmusa, mivel az *ntr* rendszer, mely a szabadon élő nitrogénkötő *Klebsiella pneumoniae* esetében a *nif* gének kötött nitrogén általi szabályozásáért felelős, a gümőben nem működik. (Fischer, 1994).

### 1.5. A lucerna gümő szén és nitrogén metabolizmusa

A baktérium által megkötött nitrogén ammónia formájában, passzív diffúzió útján kerül a peribakteroid térbe, ahol ammónium ionná alakul, majd a PBM-ben nagy számban található, kis áteresztő képességű egyszeres töltésű kation csatornákon jut a növény citoszoljába (Tyerman és mtsai, 1995). Az ammóniumion jelenléte toxikus a növények számára, ezért a megkötött nitrogén azonnal aminosavakba épül be (4. ábra).

A lucerna gyökerében ennek a folyamatnak az első két lépését, melyek során glutamin és glutamát keletkezik, a glutamin szintetáz (GS), valamint a glutamát szintáz (GOGAT) enzimek végzik. A GS katalizálja az  $\text{NH}_4^+$  beépülését a glutamát amid pozíciójába, melynek eredményeként glutamin jön létre. A GOGAT katalizálta reakcióban a glutamin amid csoportja átkerül a 2-oxoglutarát  $\alpha$ -keto pozíciójába, melynek során két glutamát keletkezik. Mindkét fehérjének több izoformája létezik lucernában, a gümőben jelentős szerepet a GSI citoplazmatikus enzim GS13 izoformája (Temple és mtsai, 1995), valamint a NADH-GOGAT (Vance és mtsai, 1995) töltenek be. Mindkettő enzimre, és az őket kódoló génekre jellemző, hogy aktivitásuk ill. transzkripciójuk mértéke többszörösére nő a gümőfejlődés beindulásával (Temple és mtsai, 1995; Vance és mtsai, 1995), de szabályozásuk még nem tisztázott. NADH-GOGAT esetében kimutatták, hogy ineffektív gümőben, ill. nitrogénkötés csökkenését okozó hatások (pl. ammónia jelenléte) következtében aktivitása csökken (Vance és mtsai, 1983), a GS-ről azonban ellentmondó adatok ismertek. Szójában a GS gén expressziója függ a külső és a kötött nitrogén jelenlététől (Hirel és mtsai, 1987; Marsolier és mtsai, 1993), míg más fajokban (*Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris*) a működése ezektől a tényezőktől független (Cock és mtsai, 1990; Stanford és mtsai, 1993).





Lucernában a nitrogén elsősorban aszpartát és aszparagin formájában transzportálódik, melyek előállításáért az aszpartát-amino-transzferáz (AAT), valamint az aszparagin szintetáz (AS) felelősek. Az AAT szabályozásáról, csakúgy, mint a NADH-GOGAT enziméről annyi ismert, hogy ineffektív gümőben, valamint egyes környezeti tényezők hatására csökken az aktivitása, valamint hogy a gén kifejeződése nagymértékű növekedést mutat a nitrogénkötés beindulásával egy időben (Egli és mtsai, 1989).

A gümő nitrogén asszimilációs útja az oxálacetáton keresztül szoros kapcsolatban áll a növényi szén anyagcserével (4. ábra), mely feladata a bakteroid nitrogénkötéséhez nélkülözhetetlen szén- és energiaforrás biztosítása. A kutatások szerint a meghatározó folyamat a nitrogénkötés, mivel a gazdanövény szénforrás termelésének fokozásával alkalmazkodni tud az esetleges intenzívebb nitrogénfixáláshoz (Jording és mtsai, 1994; Udvardi és Day, 1994).

A gümő elsődleges szénforrása a fotoszintézisből származó szacharóz. A bakteriodok azonban csak a C<sub>4</sub>-dikarbonsavakat tudják hasznosítani (Miller és mtsai, 1988). A szacharózból a szacharóz szintáz (SS) segítségével egy glükóz molekula hasítódik le, mely foszfoenol-piruváttá bomlik, amelyet a foszfoenol-piruvát karboxiláz (PEPC) karboxilál. A keletkező oxálacetátot a malát dehidrogenáz (MDH) alakítja át maláttá, amely a szukcinát mellett a bakteroid elsődleges energia- és szénforrása (Vance, 1991). A bakteroidok a dikarbonsavakat egy transzporter segítségével veszik fel, melyet a *dctA* gén kódol (Jording és mtsai, 1994). A malát szintézis út enzimei mellett a karbonsav anhidráznak (CA) is fontos szerepe van a gümő szén anyagcseréjében (Badger és mtsai, 1994). A megnövekedett metabolitikus folyamatok velejárójaként, nagy mennyiségű respirációs CO<sub>2</sub> jut a gümőbe, amelyet a CA és PEPC

kötnek meg (Vance és mtsai, 1994). A széndioxidból a CA katalizálta folyamatban  $\text{HCO}_3^-$  keletkezik, mely a PEPC szubsztrátja (Hatch és Burnell, 1990).

A gümő szén metabolizmusának szabályozása még kevésbé ismert. A PEPC és MDH aktivitása emelkedik a nitrogénkötés beindulásával egy időben (Pathirana és mtsai 1992; Miller és mtsai, 1998). A PEPC esetében azt is megfigyelték, hogy ineffektív gümőben, valamint a nitrogénkötést gátló külső tényezők (pl. ammónia jelenléte) hatására aktivitása csökken (Vance és mtsai, 1983; Pathirana és mtsai, 1992).

## 1.6. Kísérleti előzmények

A dolgozatomban leírt munka a csoportunk által elkezdett kutatási téma egy részének folytatása. A teljes program a szimbiotikus gümő fejlődésében szerepet játszó szignálmolekulák, és a szintézisüket szabályozó bakteriális regulátor gének izolálása és jellemzése, valamint a környezeti tényezők általi szabályozásuk vizsgálata.

Az első bakteriális jelmolekula, a Nod-faktor termeléséért felelős *nod* gének szabályozásában a *syrM* gén fontos szerepet tölt be, mely a *nodD3* gén közreműködésével valósul meg (Maillet és mtsai, 1990; Kondorosi és mtsai, 1999b; Swanson és mtsai, 1993), így a *syrM* is részt vesz a *nod* gének *ntr* rendszer és *nodD3* által közvetített, környezeti nitrogén szint szerinti regulációjában (Dusha és Kondorosi, 1993). A luteolin feltehetően szintén befolyásolja a *syrM-nodD3* gének expresszióját, mivel nitrogén éheztetés mellett indukálja a *nodD3* transzkripcióját (Dusha és mtsai, 1989).

A *syrM* génről megfigyelések alapján feltételezni lehetett, hogy túl a *nod* gének szabályozásán, valószínűleg részt vesz a szimbiózis későbbi folyamatainak regulációjában is. A *syrM* mutáns *S. meliloti* 41 és 1021 törzsek (Kondorosi és mtsai,

1991b, Dusha és mtsai, 1999) a vadnál később, és kevesebb gümőt indukálnak a gazdanövény gyökerén, amely jelenség kötött nitrogén jelenlétében is megfigyelhető (Dusha és mtsai, 1999). Ez a hatás azonban nem a *nod* gének alacsonyabb szintű transzkripciójának eredménye, hiszen a *nodABC-lacZ* fúzió a vad háttérben mérthez hasonló szinten fejeződik ki a *syrM* mutánsban is (Dusha és Kondorosi, 1993). Feltételezték, hogy a *syrM* részt vesz az invázió folyamatában is, amelyet alátámasztottak Mulligan és Long (1985) eredményei is, akik azt tapasztalták, hogy a *syrM-nodD3-syrA* régió bejuttatása a baktériumba mukoid fenotípust, azaz megnövekedett mennyiségű EPS termelést eredményez. Tn5 inszerció a *syrM* vagy *syrA* génben az eredeti fenotípus helyreállításához vezetett. Kísérleteik alapján feltételezték, hogy a SyrM a *syrA* génen keresztül hathat egyes *exo* génekre, ill. az EPSI szintézisre (Barnett és mtsai, 1998). Kimutatták, hogy az invázióban részt vevő baktériumok jelenléte, illetve tisztított Nod-faktor adása a növény fenilpropnoid bioszintézis útjának indukcióját váltják ki (Savouré és mtsai, 1994), amely a *nod* gének pozitív regulációjában szerepet játszó flavonoid vegyületek termelését is magában foglalja (Dakora és mtsai, 1993). Feltételezik, hogy ez a hatás szerepet játszik a szimbiózis kialakulásának későbbi folyamatainak, feltehetően a baktérium invázióinak pozitív szabályozásában is, így valószínűleg a luteolin a további, invázióhoz szükséges bakteriális szignálmolekuláknak, mint például az EPSI szintézisének a regulációjában is részt vesz.

Mivel úgy tűnt, hogy a *syrM* a *nod* és *exo* gének közös szabályozója, felmerült a *syrM-nodD3* páros közvetítő szerepe az *exo* gének expressziójának nitrogén és luteolin általi szabályozásában is, csakúgy, mint a *nod* gének esetében. Csoportunk ezért célul tűzte ki az *S. meliloti* EPSI termelésének nitrogén és luteolin általi szabályozásának,



valamint a *syrM* ezen folyamatokban betöltött esetleges regulátor szerepének vizsgálatát.

Munkám kezdetekor a következő eredmények voltak ismertek:

-vad típusú baktériumban mind a nitrogén, mind a luteolin befolyásolja a termelő EPSI mennyiségét és minőségét, valamint, hogy ezekben a folyamatokban a *syrM* is részt vesz.

A vad típusú és a *syrM* mutáns törzs EPSI termelésének kromatográfiás vizsgálatát Dr. Dusha Ilona és dr. Borzi Miklósné végezték, de a jobb érthetőség érdekében a kísérletek az „Eredmények” részben szerepelnek.

Az első bakteriális jelmolekula, a Nod-faktor termelése a talaj kötött nitrogén szintjének szabályozása alatt áll: a *nod* gének kifejeződése gátolt magas nitrogén koncentráció jelenlétében (Dusha és mtsai, 1989). Csoportunk egy kísérlet sorozatban a Nod-faktor szignálmolekula szintézisének regulációját és a nitrogén represszió hatását tanulmányozva egy Tn5 mutagenézis eredményeképpen izolálta az *S. meliloti* 399 törzset, melyben a *nodABC* és *nodD3* gének még magas ammónium koncentráció mellett is kifejeződnek (Dusha és mtsai, 1989). A génről (*ntrR*), amelyet a mutáció érintett, feltételezték, hogy egy represszor molekulát kódol. Növényi tesztben azt az eredményt kapták, hogy mind nitrogén éheztetéskor, mind pedig ammónium szulfát jelenlétében a mutáns törzs a vadnál előbb, és nagyobb számban indukál gümőt a lucerna gyökerén (Dusha és mtsai, 1989), valamint az általa fertőzött növények szárazanyag súlya, és fajlagos nitrogén tartalma magasabb a vad típusú baktériummal fertőzött növényekhez képest (Oláh és mtsai, 2000- beküldve). Az *ntrR* mutáció szimbiózisra gyakorolt hatásának növényi teszt kísérleteit Dr. Dusha Ilona és dr. Borzi

Miklós né végezték, de a részletes értékelésük logikai okokból az „Eredmények” részben is szerepel.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozat eredményeit képező munka megkezdésekor ismeretes volt, hogy a *S. meliloti* lucernával kialakított szimbiózisának több lépése (noduláció, EPSI termelés) a környezet kötött nitrogén szintje szerinti szabályozás alatt áll, melynek közvetítésében a baktérium részéről fontos szerepet játszik a *syrM* és az *ntrR* gén. Ismeretlen volt azonban, hogy e két gén mely folyamatokon keresztül befolyásolja a noduláción túl az EPSI termelést (*syrM*), illetve a hatékonyabb szimbiózis kialakulását (*ntrR*).

Ezek alapján célul tűztem ki a *syrM* és az *ntrR* gének e folyamatok nitrogén általi szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatát, melyet az alábbi részfeladatok megoldása során próbáltam elérni:

### 1. A *syrM* mutáció hatása az *S. meliloti* EPSI termelésére

-a *syrM* mutáns és a vad típusú *S. meliloti* által különböző növesztési körülmények között termelt EPSI kromatográfiás analízise annak vizsgálatára, hogy a SyrM részt vesz-e az EPSI szintézis kötött nitrogén, illetve luteolin általi szabályozásában,  
-annak tanulmányozására, hogy vajon milyen, a megváltozott mennyiségű és minőségű EPSI szintézist magyarázó molekuláris változások következnek be a *syrM* mutánsban, az egyes, EPSI termelésben, módosításban, polimerizációban illetve transzportban résztvevő reprezentatív *exo* gének (*exoF, P, H, K*) nitrogén és luteolin általi szabályozásának vizsgálata génexpresszió szintjén vad típusú és *syrM* mutáns háttérben.

### 2. Az *ntrR* génben bekövetkezett mutáció hatása a szimbiózis hatékonyságára

-annak eldöntésére, hogy az *ntrR* mutáns baktérium nagyobb szimbiotikus hatékonysága megnövekedett nitrogénkötési képesség eredményeképpen alakul-e ki, a *nifH* és *nifA* nitrogénfixálási gének kifejeződésének összehasonlítása *ntrR* mutáns és vad háttérben, nitrogén hiányában és jelenlétében,



-annak vizsgálatára, hogy vajon az *ntrR* mutáns hatékonyabb nitrogénkötése hatással van-e a növényi ammónia asszimilációs út, valamint a bakteroid energia- és szénforrását biztosító növényi szén anyagcsere út enzimeit kódoló gének kifejeződésére, ezen gének (AAT:aszpartát-amino-transzferáz, CA:karbonsav anhidráz, GS:glutamin szintetáz, NADH-GOGAT:glutamát szintáz, MDH:malát dehidrogenáz, PEPC:foszfoenol-piruvát-karboxiláz, SS:szacharóz szintáz) transzkripciójának összehasonlítása kötött nitrogén hiányában és jelenlétében, vad típusú és *ntrR* mutáns baktériumok által indukált gümőkben.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok

A disszertációban szereplő baktérium törzseket, bakteriofágokat és plazmidokat az 1. táblázatban tüntettem fel.

1. táblázat. Baktérium törzsek, bakteriofágok, plazmidok.

elnevezés	jellemzők	hivatkozás/forrás
<b>Baktériumok</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 (lac-proAB) (F' traD36 proAB lacIqZdM15)</i>	Yanish-Perron és mtsai, 1985
HB101	<i>hsdS hsdM pro leu thi gal lacY recA str</i>	Boyer és Roulland-Dussoix, 1969
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
1021	vad típusú, SU47 Sm <sup>R</sup> származéka	F. M. Ausubel
399	<i>S. meliloti</i> 1021, <i>ntrR</i> ::Tn5	Dusha és mtsai, 1989
7095	<i>S. meliloti</i> 1021, <i>exoR95</i> ::Tn5	Doherty és mtsai, 1988
8002	<i>S. meliloti</i> 1021, Pho <sup>-</sup>	Long és mtsai, 1988a
8272	<i>S. meliloti</i> 8002, <i>exoP272</i> ::TnphoA	Reuber és mtsai, 1991
8268	<i>S. meliloti</i> 8002, <i>exoF268</i> ::TnphoA	Reuber és mtsai, 1991
8445	<i>S. meliloti</i> 1021, <i>exoK445</i> ::Tn5	Long és mtsai, 1988b
AT19	<i>S. meliloti</i> 1021, <i>exoB</i> ::Tn5	Kereszt A.
EK217	<i>S. meliloti</i> 1021, <i>syrM</i> ::Tn5	Kondorosi és mtsai, 1991b
H1A	<i>S. meliloti</i> 2011, <i>exoH-lacZ</i>	Becker és mtsai, 1993b
H2A	<i>S. meliloti</i> 2011, <i>exoK-lacZ</i>	Becker és mtsai, 1993b
OB81	<i>S. meliloti</i> 1021, <i>syrM</i> ::Cm <sup>R</sup>	Dusha és mtsai, 1999
OB82	<i>S. meliloti</i> H2A, <i>syrM</i> ::Cm <sup>R</sup>	Dusha és mtsai, 1999
OB83	<i>S. meliloti</i> H1A, <i>syrM</i> ::Cm <sup>R</sup>	Dusha és mtsai, 1999
OB84	<i>S. meliloti</i> 8272, <i>syrM</i> ::Cm <sup>R</sup>	Dusha és

<b>Plazmidok</b>		mtsai, 1999
pBR322	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Bolivar és mtsai, 1977
pBR322::Tn5-Cm	Tn5 transzpozonból származó Cm <sup>R</sup> gént hordozó pBR322 származék	Sasakawa és Yoshikawa, 1987
pPH1JI	Gm <sup>R</sup> , IncP	Beringer és mtsai, 1978
pRK290	Tc <sup>R</sup> , IncP	Ditta és mtsai, 1980
pCHK57	<i>nifA-lacZ</i> fúzió pRK290 vektorban	Ditta és mtsai, 1987
pRKP9	<i>nifH-lacZ</i> fúzió pRK290 vektorban	Szeto és mtsai, 1987
pNID6	a <i>nodD3-syrM</i> gént hordozó 7.2 kb fragment pRK290 vektorban	Györgypál és mtsai, 1988
pPP375	az EcoRI helyén multi klónozó helyet hordozó pRK290 vektor	Putnoky P.
pBO19	a pNID6 plazmidból kivágott, <i>syrM</i> gént hordozó 3.5 kb BamHI-ClaI fragment pPP375 vektor BamHI-ClaI helyére klónozva	Dusha és mtsai, 1999
pBO20	pBR322::Tn5-Cm-ből származó, Cm <sup>R</sup> gént hordozó 1.4 kb HindIII fragment a pBO19 plazmidban a <i>syrM</i> gén XbaI helyére ligálva	Dusha és mtsai, 1999
pVK101	Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , IncP	Knauf és Nester, 1982
pBO7	pVK101 származék, amelyből a Tc <sup>R</sup> gént tartalmazó SmaI fragmentet eltávolították	Dusha és mtsai, 1999
pAAT37	<i>M. sativa</i> AAT-2 cDNS pBluescript KS(-) vektorban	Gantt és mtsai, 1992
pGOGAT7.2	<i>M. sativa</i> NADH-GOGAT cDNS pBluescript KS(+) vektorban	Gregerson és mtsai, 1993
pneMDH	<i>M. sativa</i> neMDH cDNS pBluescript KS(+) vektorban	Miller és mtsai, 1998
pMsc1	<i>M. sativa</i> CA cDNS pBluescript SK(+) vektorban	Coba de la Pena és mtsai, 1997
pMtGSa	<i>M. truncatula</i> GSa cDNS pBluescript SK(-) vektorban	Carvalho és mtsai, 1997
pMsSS	<i>M. sativa</i> SS cDNS pBluescript SK(+) vektorban	Coba de la Pena és mtsai, 1997
pPEPC-61	<i>M. sativa</i> PEPC cDNS pBluescript KS(-) vektorban	Pathirana és mtsai, 1992
<b>Bakteriofágok</b>		
M12		Finan és mtsai, 1984

### 3.2. Mikrobiológiai eljárások

Az *E. coli* törzseket LB tápközegben (Maniatis és mtsai, 1982) 37 °C-on, a *S. meliloti* törzseket 34 °C-on komplett táptalajban (Kondorosi és mtsai, 1984), vagy nitrogénforrást nem tartalmazó M9 (Miller, 1972), ill. GTS (Kiss és mtsai, 1979) minimál táptalajokon növesztettük, utóbbiakat a kísérleti körülményeknek megfelelő mennyiségben egészítettük ki kötött nitrogénnel (ld. „Módszerek” idevonatkozó részeiben). A rezisztencia-markert hordozó törzsek táptalaja a 2. táblázatban feltüntetett koncentrációban tartalmazta a megfelelő antibiotikumokat.

A pRK290 plazmid származékait triparentális keresztezés útján, konjugációval juttattuk be *E. coli* törzsekből *S. meliloti* baktériumokba (Ditta és mtsai, 1980).

**2. táblázat.** Az alkalmazott antibiotikumok végkoncentrációja (µg/ml)

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>S. meliloti</i>
ampicillin	100	-
kloramfenikol	30	60
gentamicin	10	200
kanamicin	50	200
streptomycin	100	200
tetraciklin	10	15

### 3.3. Rekombináns DNS technikák

A plazmid DNS-ek tisztítását, restrikciós endonukleázokkal való emésztésüket, az agaróz gélelektroforézist, a DNS fragmentek izolálását és klónozását, valamint az *E. coli* törzsek transzformálását Maniatis és mtsai (1982) által leírt módszerek szerint végeztük el. A klónozási munkák során alkalmazott enzimeket és vegyszereket a gyártó cégek javaslatait szem előtt tartva alkalmaztuk.

### 3.4. $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitásának mérése baktérium kultúrából

Az *exoK-lacZ* ill. *exoH-lacZ* fúziót hordozó vad típusú és *syrM* mutáns baktériumokat éjszakán át növesztettük komplett táptalajban, majd centrifugálás után nitrogénmentes GTS (GTS-N) táptalajjal átmostuk. Annyi baktérium kultúrával oltottuk be a következő négyféle összetételű táptalajt, hogy az optikai sűrűség 0.1 legyen 600 nm-en: 1. GTS-N + 3 mM ammónium szulfát, 2. GTS-N + 3 mM ammónium szulfát + 10  $\mu$ M luteolin, 3. GTS-N + 50 mM ammónium szulfát, 4. GTS-N + 50 mM ammónium szulfát + 10  $\mu$ M luteolin. A baktériumokat a táptalaj  $OD_{600}=0.6-0.8$  értékéig növesztettük 34 °C-on, majd a termelődött  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitásának mérését Miller (1972) módszere alapján végeztük el. Az enzimaktivitást Miller egységekben számítottuk ki. A méréseket 3-4 független növesztésből, két párhuzamos reakcióban végeztük el.

### 3.5. Alkalikus foszfatáz aktivitásának meghatározása baktérium kultúrából

Az *exoF::phoA*, ill. *exoP::phoA* fúziót hordozó vad típusú ill. *syrM* mutáns baktérium törzseket komplett táptalajban éjszakán át felnövesztettük, majd lecentrifugáltuk, és megmostuk 1xTris-N-P táptalajban (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaCl, 2 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5  $\mu$ g/ml biotin, és 0.2 % szacharóz). A baktériumokat 0.2-es optikai sűrűségig ( $OD_{600}$ ) hígítottuk a következő táptalajokban: 1. 1xTris-N-P + 3 mM ammónium szulfát, 2. 1xTris-N-P + 3 mM ammónium szulfát + 10  $\mu$ M luteolin, 3. 1xTris-N-P + 20 mM ammónium szulfát, 4. 1xTris-N-P + 20 mM ammónium szulfát + 10  $\mu$ M luteolin. A baktériumokat 34 °C-on 72-120 óráig növesztettük síkrázóban, majd Brickman és Beckwith (1975) módszere szerint 24 órás időközönként megmértük az



alkalikus foszfatáz aktivitást. Az aktivitás értékeket 4-5 független növesztésből, két párhuzamos reakcióban határoztuk meg.

### 3.6. *S. meliloti* törzsek EPS termelésének meghatározása

A vad, *syrM*, *exoB* ill. *exoR* mutáns baktériumokat 0.5-ös optikai denzitásig (600 nm) növesztettük 34 °C-on. Minden kultúrából 4x20 ml-t lecentrifugáltunk, majd a baktériumokat nitrogénmentes M9 táptalajban (M9-N) megmostuk, és felfuszpendáltuk a következő táptalajokban: 1. M9-N, 2. M9-N+10 µM luteolin, 3. M9-N+ 20 mM ammónium szulfát, 4. M9-N+ 20 mM ammónium szulfát + 10 µM luteolin. Minden esetben kiegészítettük a táptalajt magnézium szulfáttal (1mM), biotinnal (0.5 µg/ml), valamint szacharózzal (0.2 %). A kultúrákat 34 °C-on, 40 óráig növesztettük síkrázóban. Mintánként 10 ml-t használtunk fel EPS izoláláshoz. Centrifugálás után 0.3 térfogat hexadeciltrimetil-ammónium bromidot (cetrimid) adtunk a felülúszóhoz Leigh és mtsai (1985) szerint. A csapadékot 10% nátrium kloridban oldottuk fel, majd fenol-kénsavas módszerrel (Dubois és mtsai, 1956) meghatároztuk hexóz tartalmát.  $OD_{485}=0.1-0.4$  értéktartományban mértük a cukortartalmat (ha szükséges volt hígítást alkalmazva), amely a kontrollként készített glükóz kalibrációs görbén még a lineáris szakaszba esett. A maradék 10 ml kultúrát használtuk fel totál sejtfehérje meghatározáshoz. A baktériumokat 10% NaOH oldattal feltártuk, majd a fehérje mennyiségét Bio-Rad (Richmond, CA) reagenssel állapítottuk meg, BSA-t (bovine serum albumin) használva standardként. Az exopoliszacharid termelést 2-4 független növesztésből határoztuk meg.

### 3.7. EPSI izolálása, valamint kromatográfiás analízise

A vizsgált *S. meliloti* törzseket 34 °C-on, síkrázóban, komplett táptalajon növesztettük OD<sub>600</sub>=0.5 optikai sűrűségig. Egy adott baktérium kultúrából négyszer 250 ml mintát külön-külön lecentrifugáltunk, majd M9-N táptalajban megmostuk, és felfuszpendáltuk az alábbi táptalajokban: 1. M9-N, 2. M9-N+10μM luteolin, 3. M9-N+20mM ammónium szulfát, 4. M9-N+ 20 mM ammónium szulfát + 10μM luteolin. 40 óras, 34 °C-on való növesztés után a baktériumokat centrifugálással eltávolítottuk, és a felülúszót liofileztük. A HMW és LMW formák elválasztásához a liofilezett mintákat feloldottuk 100 mM nátrium kloridot tartalmazó 50 mM nátrium foszfát pufferben (pH 7.0), majd Bio-Gel A5m oszlopon (2.5x56 cm) kromatografáltuk. 6.8 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, majd fenol-kénsavas méréssel meghatároztuk hexóz tartalmukat. Mivel a LMW formának megfelelő frakciók részben egybeestek a táptalajban maradt szacharóz tartalmazó frakciókkal, a szacharóz eltávolításának céljából az LMW frakciókat 10 térfogat abszolút etanolban kicsaptuk, lecentrifugáltuk, megszárítottuk, majd vízben feloldottuk, és ismét megmértük hexóz tartalmukat. A totál EPSI tartalmat a két csúc alatti terület összeadásával határoztuk meg. A HMW és LMW mennyiségét a totál EPSI tartalom százalékában adtuk meg. Az EPSI izolálását és kromatográfiáját minimum háromszor végeztük el, az eredmények ismételhetőségét a független kísérletek adataiból számított szórás (SD) mutatja (totál EPSI: ±6-20%, csúcsok területe vad baktérium esetében ±4-8%, míg a mutánsok esetében ±1.5-7.8%).

### 3.8. Az EPSI frakciók hexóz komponenseinek meghatározása

A meghatározáshoz Köplin és munkatársainak (1983) módosított módszerét használtuk. A poliszacharid mintákat 2M trifluoecetsavban 100 °C-on hidrolizáltuk. A savmaradékot kloroformmal eltávolítottuk, majd a monoszacharidokat tartalmazó

anyagot beszárítottuk, és újra oldottuk vízben. A glükóz és galaktóz tartalmat HPLC módszerrel, Bio-Rad Aminex HPX-87 oszlopon, refraktív index detektor segítségével határoztuk meg. A HPLC módszeres meghatározást Szegletes Zsolt végezte el.

### 3.9. Szimbiotikus hatékonyság vizsgálata

A növényi teszthez használt lucerna (*Medicago sativa* ssp. *sativa* v. Sitei) magvakat 95%-os etanolban (2 perc) és 0.2 %-os HgCl<sub>2</sub> oldatban (5 perc) sterilizáltuk, majd többszöri steril desztillált vizes öblítés után 1%-os vizes agaron egy éjszakán át sötétben csíráztattuk. 100 csíranövényt ültettünk ki előzőleg nitrogénmentes ill. 2mM ammónium szulfátot tartalmazó Gibson táptalajjal (Gibson és Nutman, 1980) átmosott perlittel megtöltött edényekbe (18x18 cm). Minden kezeléshez 500 csíranövényt használtunk. A komplett táptalajban, antibiotikum mellett O/N növesztett vad típusú és *syrM* mutáns *S. meliloti* baktériumokat lecentrifugáltuk, nitrogénmentes Gibson táptalajjal átmostuk, majd 0.1 ml/növény mennyiségű kultúrával lefertőztük a növényeket. Kontrollként mind a kettő típusú táptalajon növesztettünk 500-500 db fertőzetlen növényt is. A növényeket üvegházban neveltük két hónapig 20-22 °C-on, 16/8 óra nappal/éjszaka periódusban, majd összegyűjtöttük a leveleket és a szárazakat. A levél/növény arányt kiszámoltuk, a növényeket tízesével összegyűjtöttük, 48 óráig 68 °C-on szárítottuk, majd megmértük a szárazanyag súlyt. A fajlagos nitrogéntartalmat automata Kjeldahl analizátorral határoztuk meg.

### 3.10. Növényi anyag előállítása génexpresszió vizsgálatokhoz

A növényi teszthez használt lucerna magvakat az előző pontban leírtak szerint sterilizáltuk és csíráztattuk, majd a csíranövényeket nitrogénmentes, ill. 2mM ammónium

szulfáttal kiegészített Gibson táptalajt tartalmazó csövekbe helyeztük, és üvegházban neveltük (16 óra fényperiódus, 22 °C).

A növények fertőzésére használt baktériumokat éjszakán át növesztettük komplett tápoldatban, majd centrifugálás után nitrogénmentes Gibson táptalajban megmostuk és felfuszpendáltuk. A két napos csíranövényeket 0.2 ml/növény szuszpenzióval fertőztük le.

A bakteriális génexpresszió vizsgálatához a gümöket a 9-12. napon naponként, míg az RT-PCR (reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció) analízishez csak a 9. és 12. napon gyűjtöttük be, ügyelve arra, hogy a különböző baktérium törzsekkel fertőzött növényekről mindig azonos számú, és azonos korú gümöt szedjünk le, elkerülendő a gümözés idejének eltolódásából adódó hibákat.

### 3.11. RNS izolálás és RT-PCR kísérletek növényi anyagból

A vizsgált növényi gének transzkripciójában bekövetkező változások követésére RT-PCR analízist végeztünk 1 µg totál RNS felhasználásával, melyet „RNeasy plant mini kit” (Qiagen) segítségével izoláltunk a fertőzéstől számított 9. ill. 12. napon gyűjtött lucerna gümökből. A három független növényi tesztből nyert RNS minták transzkripciójához „First Strand cDNA Synthesis Kit”-et (Amersham Pharmacia Biotech.) használtunk. A megfelelő cDNS-eket 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP és 2 µM primer koncentráció mellett amplifikáltuk. A primer párok, melyeket a növényi gének 3' nem transzlálódó régiójához terveztünk, a következők voltak: **AAT-2** (5'-ATGATGGCTGGAAGGATA-3'; 5'-CAGGTATTCACATTTGGC-3'); **CA** (5'-GCACTGCTGGGAGGTTAC-3'; 5'-GAGTTGAGATAGTGGTCC-3'); **NADH-GOGAT** (5'-CTGGGAGAAAGATGAAAC-3'; 5'-CATACCACAAGCGACTGA-3'), **GS** (5'-GAAACAGCAGACATCAACAC-3'; 5'-TAGAGTAAAATCAAGAAGCA-3')

**neMDH** (5'-AGGGTGAAGATTGGTAGG-3'; 5'-TG TTCAGAATGCAAGCAA-3');  
**PEPC** (5'-CAAAGACTCAGACTCCGT-3'; 5'-AGCAGCAATACCCTTCAT-3') **SS**  
 (5'-AGGCTTCTTACACTCACT-3'; 5'-GGCAAAACACCCAATCAC-3').

A reakcióelegyekből, melyek belső kontrolként mindig tartalmazták 1  $\mu$ M koncentrációban a konstitutívan expresszáldó Msc27 gén (Györgyei és mtsai, 1991) átírásáért felelős primer párt is, mintát vettünk 15, 17, ill. 19 ciklus (94 °C-on 30 mp, 55 °C-on 1 perc, 72 °C-on 1 perc) után, majd a mintákat blottoltuk. Minden gén vizsgálatához 2-3 párhuzamos PCR reakciót készítettünk.

### 3.12. Hibridizáció

A Southern hibridizációhoz a DNS mintákat lefelé irányuló alkáli kapilláris transzfer módszerrel vittük át filterre (Chominsky, 1992). A radioaktív próba elkészítéséhez az adott plazmidok (ld. 1. táblázat) megfelelő, az amplifikátummal átfedő fragmentjét agaróz gélből izoláltuk, majd Oligolabelling Kit (Amersham Pharmacia Biotech.) segítségével, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP jelenlétében jelöltük meg. A hibridizáció G+C pufferben (Maniatis és mtsai, 1982) 65 °C-on, 16-20 óráig folyt, majd a filtereket 0.5xSSC-0.1%SDS oldatban mostuk, szintén 65°C-on. A hibridizációs jelek erősségét és arányát Phosphoimager műszerben, ImageQuant software csomag (Molecular Dynamics) segítségével határoztuk meg.

### 3.13. A *nifA-lacZ* és *nifH-lacZ* fúzió $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának mérése lucerna gümőben

A lucerna csírákat olyan vad és *ntrR* mutáns *S. meliloti* baktériumokkal fertőztük, melyek plazmidon hordozzák a *nifH-lacZ*, illetve a *nifA-lacZ* fúziót (a fúziókat triparentális keresztezés útján konjugációval juttattuk *E. coli* törzsből a

megfelelő *S. meliloti* törzsekbe). Az összegyűjtött gümőket (20-30 mg) 1 ml jéghideg Mal-Tris pufferben (25 mM mannitol, 50 mM Tris, pH 7.0) összetörtük, 30 percig jégen tartottuk, majd centrifugálás (4000 rpm, 1 perc) után a felülúszót használtuk  $\beta$ -galaktozidáz enzimaktivitás; illetve fehérje tartalom meghatározásához (Bio-Rad reagents, Richmond, CA). Az enzimaktivitást, melyet Miller módszerével (1972) határoztunk meg  $1000 \times OD_{420} / OD_{595} \times \text{perc} \times \text{mg} \times \text{ml}$  egységben adtuk meg.

Mivel a baktériumok plazmidon hordozták a megfelelő fúziókat, a gümőből visszaizolálva a baktériumokat megbizonyosodtunk róla, hogy a vad és *ntrR* mutáns törzs a plazmid markerére való szelekció nélkül is, közel azonos arányban hordozzák a mérőplazmidokat, kizárva ezzel az eltérő plazmid tartalomból adódó hibákat.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A *syrM* gén szerepe a *Sinorhizobium meliloti* 1021 törzs EPS termelésében

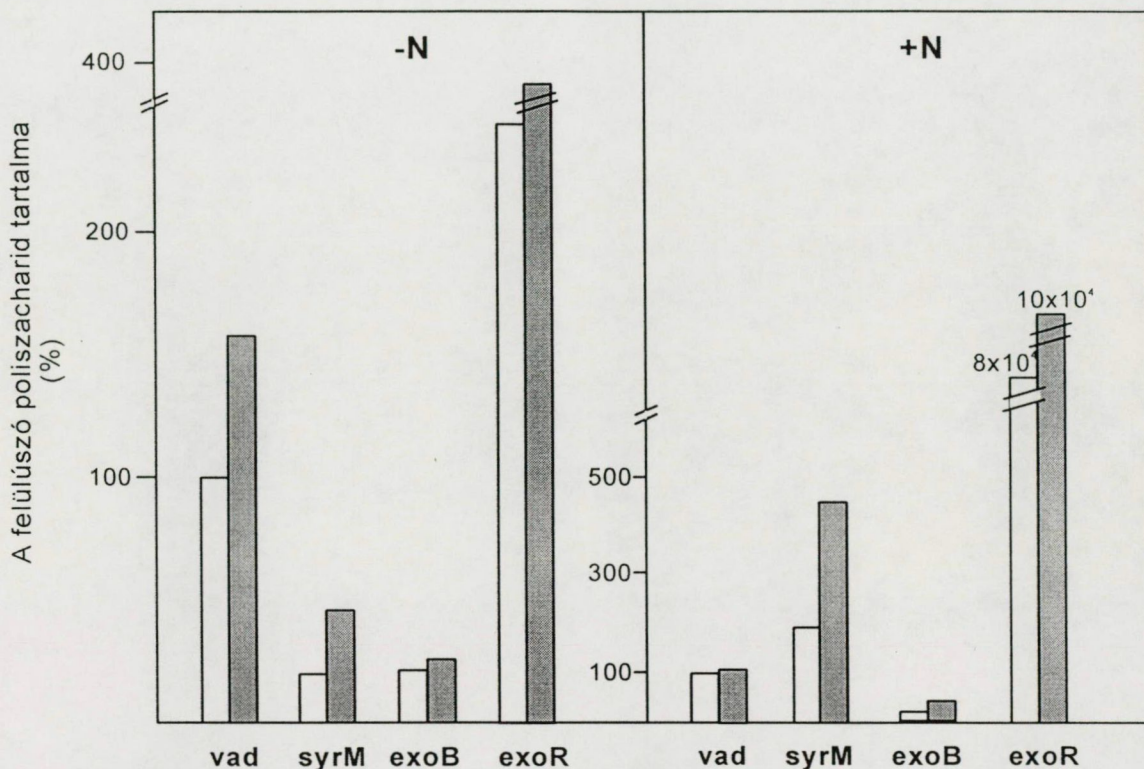
A *syrM* gén a *nodD3* génnel szabályozó párt alkotva részt vesz a baktérium Nod faktor termeléséért felelős fehérjéket kódoló *nodABC* gének nitrogén szabályozásában. Mivel azonban a *syrM* mutánsban tapasztalható, a vad típusú baktériumban mérhető értékekhez hasonló mértékű *nodABC* génexpresszió nem ad magyarázatot a mutáns szimbiotikus fenotípusára (kevesebb gümőszám az általa fertőzött növényeken), felmerült az a feltételezés, hogy a *syrM* gén a szimbiózis későbbi szakaszaiban is szabályozó szerepet tölthet be. Ezt támasztotta alá az a tény, hogy a *syrM* gént több kópiában hordozó baktérium törzs exopoliszacharid termelése megnövekedett, a baktérium ún. mukoid fenotípust mutatott.

A dolgozatomban első felében ismertetett kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy vajon a *syrM* a baktérium EPS termelésének mennyiségét hogyan és mely *exo* géneken keresztül szabályozhatja, valamint hogy szerepe van-e az EPS termelés nitrogén általi regulációjában, illetve a baktérium invázió során tapasztalt flavonoid szint növekedés EPS szintézisre gyakorolt esetleges hatásának közvetítésében.

#### 4.1.1. A vad típusú és *syrM* mutáns *S. meliloti* törzsek össz exopoliszacharid termelése

Az *S. meliloti* 1021 vad típusú törzs, és annak *syrM* mutáns származéka (*S. meliloti* EK217) által termelt össz EPS mennyiségét meghatároztuk nitrogénmentes, és 20 mM ammónium szulfátot tartalmazó táptalajban nőtt baktérium kultúrák

felülúszójából. A kapott értékeket, kiegészítve az ugyanezen körülmények között luteolin hozzáadása mellett növesztett baktériumok EPS termelésének adataival az 5. ábra mutatja. Kontrolként az EPSI és EPSII termelésben gátolt *exoB*, ill. a negatív regulátor *exoR* mutánsokat használtuk.



5. ábra Vad, *syrM*, *exoB* ill. *exoR* mutáns *S. meliloti* törzsek össz exopoliszacharid termelése. A baktérium kultúrákat minden esetben nitrogénmentes (-N), valamint 20 mM ammónium szulfát tartalmú (+N) táptalajban növesztettük luteolin nélkül (fehér oszlop), illetve 10  $\mu$ M luteolin jelenlétében (szürke oszlop). Kettő-négy független kísérletben határoztuk meg a felülúszó poliszacharid tartalmát, melynek értékét OD<sub>485</sub>/mg fehérje x ml egységben adtuk meg. Az ábra egy reprezentatív kísérlet adatait mutatja a vad baktérium esetében kapott értékek százalékában (-N: 100%=120, +N: 100%=1.6 OD<sub>485</sub>/mgxml).

A kötött nitrogén jelenléte nagymértékben gátolta a vad típusú baktériumok total EPS termelését, míg a luteolin nitrogén hiányában megnövelte a termelt EPS mennyiségét. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a baktérium total EPS termelése mind a táptalaj kötött nitrogén tartalma, mind a növényi indukálószer által szabályozott.



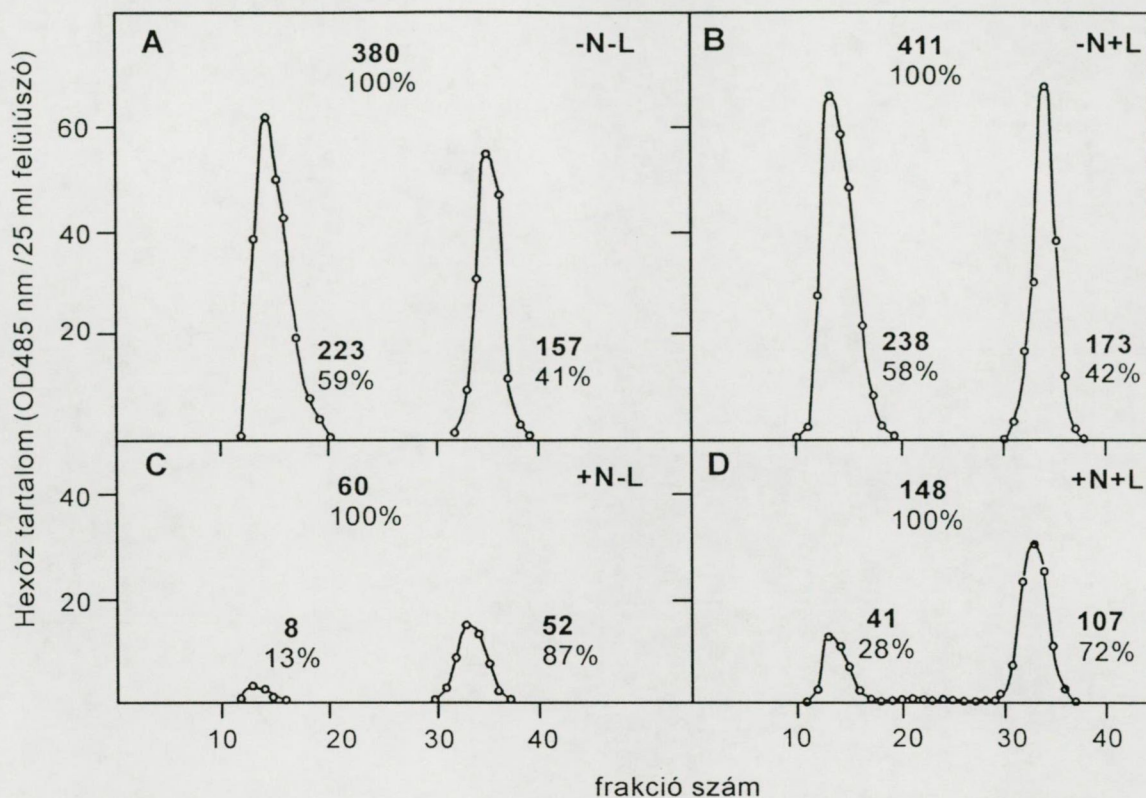
Nitrogén éheztetés mellett a *syrM* mutáns mind luteolin hiányában, mind pedig jelenlétében kevesebb EPS-t termelt, mint a vad törzs. Kötött nitrogén jelenlétében érdekes módon ezzel ellentétes eredményt tapasztaltunk, a *syrM* mutáns a vadnál több EPS-t termelt, azaz a nitrogén gátló hatása kevésbé érvényesült, amely még kifejezettebb volt, ha a táptalaj luteolint is tartalmazott.

Adataink alapján azt feltételeztük, hogy a *syrM* génnek a táptalaj nitrogén tartalmától függően ellenkező előjelű hatása van a totál EPS termelésre: nitrogén nélkül pozitív, míg nitrogén jelenlétében negatív regulációs szerepének lehetősége merült fel, valamint hogy feltehetően részt vesz a luteolin EPS termelésre gyakorolt hatásának közvetítésében is.

A *syrM* gén esetleges szabályozó szerepének felderítése érdekében mind a vad, mind pedig a mutáns törzs EPSI (szukcinoglükán) termelésének részletesebb vizsgálatát is elvégeztük az EPSI kromatográfiás elemzésével. Mind az össz EPS vizsgálatát, mind pedig a 4.1.2. és 4.1.3. pontban tárgyalt kromatográfiás vizsgálatot Dr. Dusha Ilona és munkatársai végezték.

#### **4.1.2. Az *S. meliloti* 1021 törzs EPSI termelésének mennyisége, és a kétféle molekulatömegű forma eloszlásának aránya**

A baktériumokat a 6. ábrán jelzett táptalajokban felnövesztettük, majd a liofilezett felülúszóból Biogel A5m oszlopon való kromatográfiával meghatároztuk a termelt EPSI mennyiségét, valamint a frakciók hexóz tartalmának megmérésével megállapítottuk a kétféle molekulatömegű forma (LMW-HMW) arányát. A kísérleti eredményeket a 6. ábra foglalja össze.



**6. ábra** Az *S. meliloti* 1021 vad típusú törzs által termelt szukcinoglükán (EPSI) nagy (HMW) és kis (LMW) molekulatömegű formáinak kromatográfiás szétválasztása.

A baktériumokat négyféle táptalajban növesztettük: **A**: -N-L, **B**: -N+L, **C**: +N-L, **D**: +N+L. -N és +N: nitrogénmentes ill. 20 mM ammónium szulfát tartalmú táptalaj, -L és +L: luteolin hiánya vagy jelenléte a növesztés alatt. A frakciók hexóz tartalmát OD<sub>485</sub>/25 ml felülűszó értékekben adtuk meg. Az ábra három független kísérletből egy reprezentatív adatait mutatja. Az ábrák tetején látható számok a totál EPSI tartalmat, míg a csúcsok melletti számok az egyes csúcsok által képviselt EPSI mennyiséget mutatják. A számok alatti százalékos értékek a HMW és LMW arányt mutatják a totál EPSI mennyiségének százalékában.

Az EPSI mennyiségét a kötött nitrogén jelenléte hatodára csökkentette, és megváltoztatta a kétféle molekulatömegű forma arányát is (6. ábra C-D).

Míg nitrogénmentes környezetben a HMW és LMW formák aránya 60 ill. 40 % volt, (6. ábra A-B), addig az ammónium jelenléte az LMW forma termelődését segítette elő. Mint ahogy azt a 6. ábra C-D része mutatja, luteolin nélkül 10-90 százalékra, míg luteolin jelenlétében 30-70 százalékra változott a HMW-LMW arány a nitrogénmentes mintákhoz képest. Luteolin hozzáadása nitrogén hiányában 10 százalékos (6. ábra A-B),

míg nitrogén jelenlétében mintegy két és félszeres többlet EPSI termelést okozott a luteolin nélküli mintákhoz képest (6. ábra C-D).

Annak ellenőrzésére, hogy a két kromatográfiás csúcs valóban a minták EPSI tartalmát képviseli, meghatároztuk a frakciók hexóz összetevőit. Nagynyomású folyadék kromatográfiával a szukcinoglükánra jellemző 7:1 glükóz:galaktóz arányt detektáltunk, így a vizsgált mintákról bebizonyosodott, hogy valóban a baktérium által termelt EPSI termelést reprezentálják.

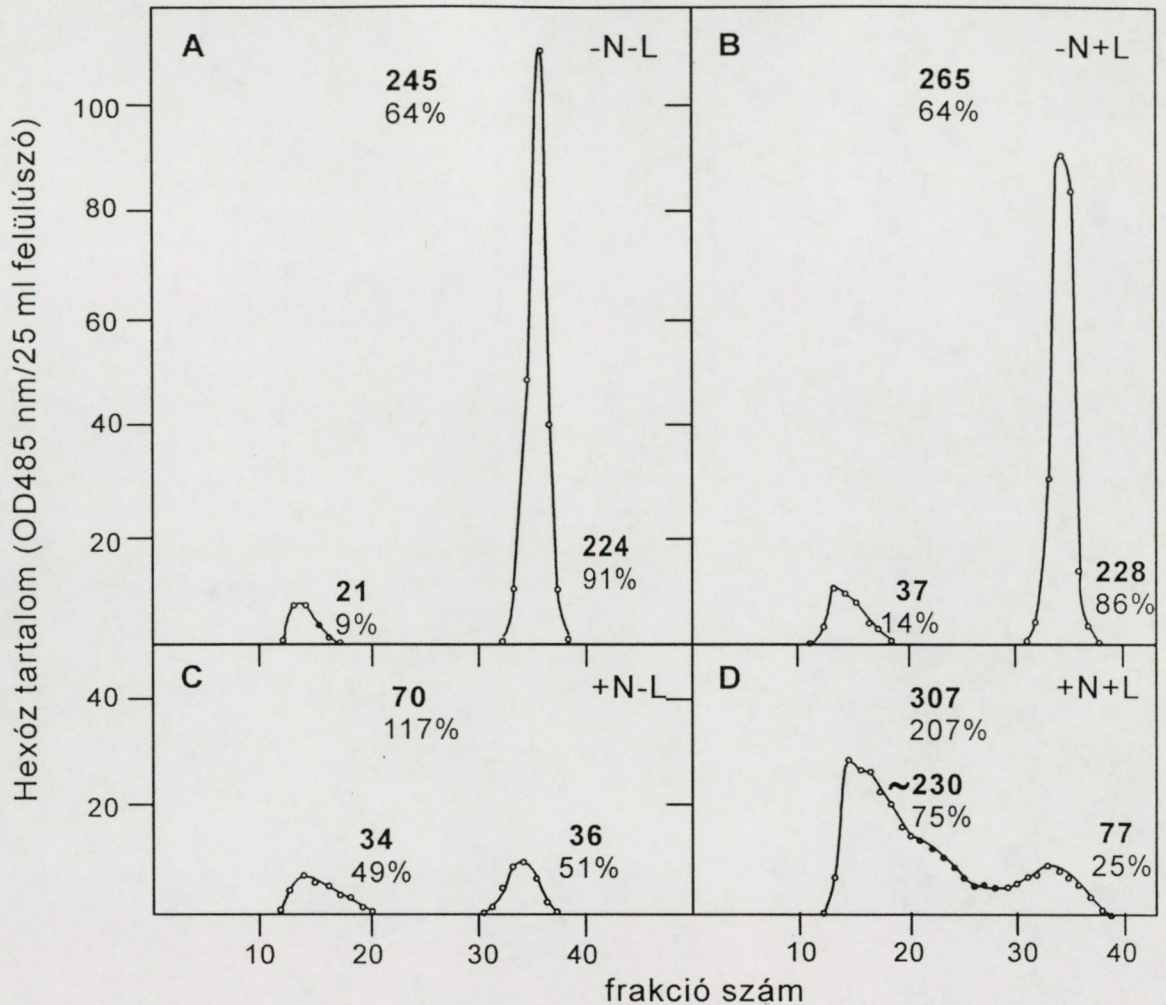
A baktérium EPSI termelésének mennyisége és minősége tehát mind a táptalaj kötött nitrogén tartalmától, mind a növényi indukálószer jelenlététől függ. A kötött nitrogén jelenléte az LMW forma felhalmozódásához vezet, és nagymértékben gátolja az EPSI termelését, míg a luteolin nitrogén hiányában kis mértékben (10%), nitrogén jelenlétében pedig jelentősen (250%) megnöveli a termelt EPSI mennyiségét.

#### **4.1.3. A *syrM* mutáció hatása az EPSI termelés mértékére, valamint a HMW és LMW formák arányára**

A vad típusú baktérium vizsgálatával megegyező módon, négyféle táptalajban felnevesztettük a *syrM* mutáns baktériumokat (*S. meliloti* EK217), majd a liofilezett felülúszóból Biogel A5m oszlopon való kromatográfiával meghatároztuk a termelt EPSI mennyiségét, valamint a kétféle molekulatömegű forma arányát a frakciók hexóz tartalmának megméréseivel. A kísérleti eredményeket a 7. ábra foglalja össze.

A *syrM* mutáns törzs felülúszójában detektálható EPSI mind mennyiségében, mind összetételében eltér a vad baktérium által termelttől. Nitrogén hiányában a mutáns törzs kevesebb (64-64% 7. ábra A-B), míg nitrogén jelenlétében több (luteolin nélkül 117%, luteolin mellett 207%: 7. ábra C-D) EPSI-et termel.





7. ábra A *syrM* mutáns *S. meliloti* EK217 törzs által termelt EPSI nagy (HMW) és kis (LMW) molekulatömegű formájának megoszlása.

A növesztési körülmények és az értékek megadása megegyezik a 6. ábránál leírtakkal. Kettő-négy független kísérletből egy reprezentatív adatait mutatja az ábra. A totál EPSI mennyiségét jelölő számok alatti % értékek a vad baktériumnál kapott megfelelő értékek százalékában mutatják a mutáns baktérium EPSI termelését. A csúcsok melletti % értékek a mutáns adott növesztési körülményben kapott totál EPSI termelésének százalékában adják meg az egyes formák arányát.

A *syrM* mutánsban tehát a nitrogén gátló hatása kevésbé érvényesül, sőt, ha luteolint is tartalmaz a táptalaj, a nitrogén gátlás teljesen elmarad. A *syrM* mutáció nemcsak az EPSI mennyiségére, hanem két fő formájának arányára is hatással van. A vad törzsnél tapasztaltakkal ellenkező eloszlást találtunk mind a nitrogénmentes, mind a nitrogéntartalmú táptalajokon. A nitrogénre éheztetett baktériumok esetében az arány 10-90% volt az LMW forma javára (7. ábra A-B), míg nitrogén jelenlétében a HMW forma felhalmozódása figyelhető meg: luteolin nélkül 50-50%, luteolin jelenlétében 75-

25% (7. ábra C-D). A +N+L körülmények között (7. ábra D) a nagy mennyiségű poliszacharid termelésen kívül még egy lényeges különbség mutatkozott: a polimerizáció fokában bekövetkezett esetleges változásra utaló átmeneti mólsúlyú exopoliszacharidnak megfelelő frakciók jelentek meg, melyek következtében nem különül el a két formát reprezentáló csúcs.

A vad törzshöz hasonlóan a minták hexóz tartalma itt is minden esetben a szukcinoglükánra jellemző 7:1 glükóz:galaktóz arányt mutatta.

Ezen kísérletek alapján feltételeztük, hogy a SyrM részt vesz a nitrogén EPSI termelésre kifejtett gátló hatásának közvetítésében, a vizsgált növesztési körülmények között befolyásolja a HMW és LMW formák eloszlását, valamint kötött nitrogén jelenlétében feladata lehet a luteolin hatásának érvényesítésében is.

#### 4.1.4. A kötött nitrogén hatása egyes *exo* gének kifejeződésére

Annak eldöntésére, hogy vajon a kötött nitrogén jelenlétében tapasztalható csökkent EPSI termelés egyes *exo* gének transzkripció szabályozásának eredménye-e, megvizsgáltuk néhány *exo* gén expresszióját különböző növesztési körülmények között (a táptalaj kötött nitrogén tartalmának alacsony ill. magas koncentrációja, valamint a luteolin jelenléte ill. hiánya mellett). A vizsgált gének az *exoF*, *exoP*, *exoK*, illetve *exoH* gének voltak.

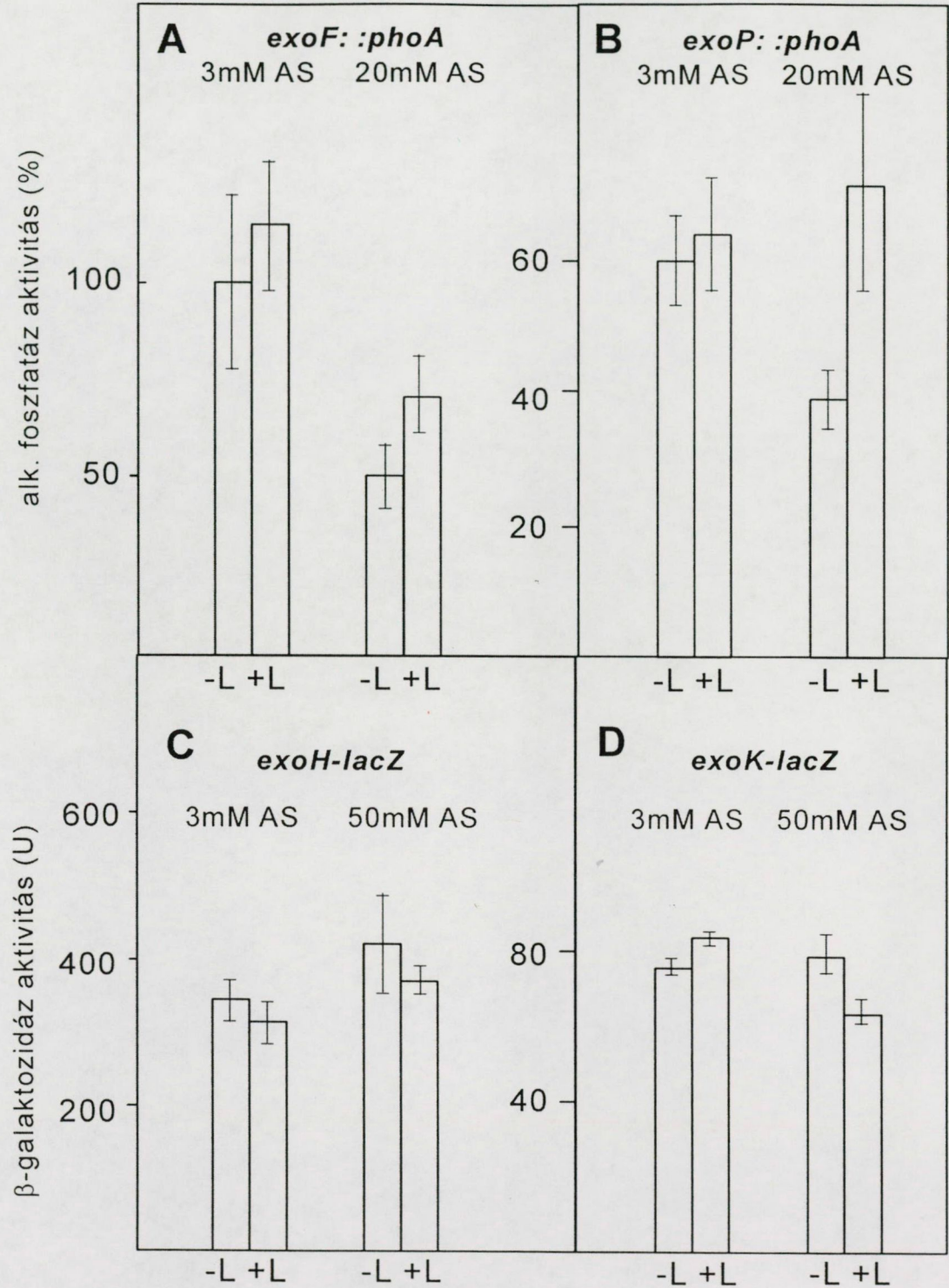
Az *exoF* gén által kódolt fehérje a szukcinoglükánt felépítő alegységek első cukormolekuláját, a galaktózt kapcsolja a szintézis helyéül szolgáló lipid hordozóhoz, így transzkripciójának változásából az EPSI termelődés korai lépéseinek esetleges szabályozására lehet következtetni. Az *exoP* gén terméke a kész alegységek polimerizációjáért és/vagy transzportjáért felelős, így mind a két forma (HMW, LMW)

megoszlását, mind pedig a sejtfelszínre jutott poliszacharid mennyiségét befolyásolhatja. A két molekulatömegű forma arányát meghatározhatja még az *exoK* gén által kódolt  $\beta$ -endoglükánáz enzim is, ezért ennek a génnek a vizsgálatát is elvégeztük. Az *exoP* és *exoK* gének az *exoHKLAMONP* operonba tartoznak, amelynek a transzkripcióját elsősorban az *exoH* gén előtti erős promóter határozza meg. Mindkét gén előtt található azonban egy gyenge promóter is, így nem zárható ki annak a lehetősége, hogy a nitrogén hatására bekövetkező esetleges transzkripciós változásuk ezeken keresztül valósul meg. Annak eldöntésére, hogy melyik promóter vesz részt a nitrogén szabályozásban, az *exoP* és *exoK* gén mellett az *exoH* gén kifejeződését is nyomon követtük, az előbbiekkal azonos kísérleti körülmények között.

Az *exoF* és *exoP* gének kifejeződését *exoF::phoA* és *exoP::phoA* genomi fúziók (*S. meliloti* 8268 ill. 8272 törzsek) segítségével alkalikus foszfatáz aktivitás mérésével, míg az *exoH* és *exoK* gének kifejeződését genomi *lacZ* fúziójuk (*S. meliloti* H1A, H2A törzsek)  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának mérésével követtük nyomon.

Az *exoK* és *exoH* gének esetében nem találtunk lényeges különbséget a négyféle növesztési körülmény között mért értékekben (8. ábra C-D), így feltehető, hogy ezen gének expresszióját sem a kötött nitrogén, sem pedig a luteolin nem befolyásolja számottevően. A magas (20 mM) ammónium szulfát koncentráció az *exoF* gén transzkripcióját mintegy felére csökkentette, a luteolin jelenléte kb. 20 százalékos növekedést okozott mindkét nitrogénszint mellett. (8. ábra A). Érdekes módon a nitrogén represszió az *exoP* esetében csak a luteolin nélkül nőtt mintákban figyelhető meg, míg luteolin jelenlétében az alacsony nitrogén koncentráció mellett mért értékkel azonos értéket kaptunk (8. ábra B).





8. ábra Az *exoF::phoA*, *exoP::phoA*, *exoH-lacZ* és *exoK-lacZ* fúziók kifejeződése *S. meliloti*-ben különböző nitrogén koncentrációjú táptalajban.

A β-galaktoszidáz valamint alkalikus foszfatáz aktivitást 1000xOD<sub>420</sub>/OD<sub>600</sub>xmLxmin egységekben adtuk meg. -L és +L: luteolin hiánya ill. jelenléte a növesztés alatt, AS: ammóniumsulfát. A β-galaktoszidáz aktivitás értékek nyolc (*exoK-lacZ*) és hat (*exoH-lacZ*) független klón párhuzamos mintáiból kapott eredmények átlagát mutatják (SD ≤ 10%). Az alkalikus foszfatáz aktivitásokat három (*exoF::phoA*) és hét (*exoP::phoA*) független klón esetében határoztuk meg. Az értékeket a -N-L körülmény mellett kapott eredmények százalékában adtuk meg. 100% *exoF* aktivitás=101±24, 100% *exoP* aktivitás=59±12 1000xOD<sub>420</sub>/OD<sub>600</sub>xmLxmin.

Adataink alapján feltételezhető, hogy az EPSI szintézis több szinten (mennyiség meghatározása, polimerizáció és/vagy transzport befolyásolása) is nitrogén szabályozás alatt áll, amelyben azonban csak egyes gének (esetünkben *exoF* és *exoP*) érintettek, míg mások a nitrogén jelenlététől függetlenül működnek. A nitrogén mellett feltehetően a luteolin is szabályozó szerephez jut mind az EPSI mennyiségének, mind minőségének meghatározásában.

#### 4.1.5. *exoP::phoA*, *exoK-lacZ* illetve *exoH-lacZ* genomi fúziókat tartalmazó *syrM* mutáns *S. meliloti* törzsek előállítás

A *syrM* génben bekövetkezett mutáció a mennyiségen kívül befolyásolta az EPSI két fő formájának arányát is, ezért azt terveztük, hogy megvizsgáljuk a *syrM* lehetséges hatását a szukcinoglükán polimerizációjában és specifikus hasításában résztvevő fehérjéket kódoló *exoP* ill. *exoK* gének kifejeződésére. Az *exoHKLAMONP* operonban az előző pontban ismertetett promóterek elhelyezkedése miatt megvizsgáltuk a *syrM* mutáció *exoH* génre gyakorolt hatását is. Mivel a vizsgálandó gének követését lehetővé tévő genomi fúziók mobilizálása nem volt kivitelezhető, elő kellett állítanunk ezen fúziós törzsek *syrM* mutáns származékát, amelyet a következő módon vittünk véghez.

A *syrM* gént egy 3.5 kb BamHI-ClaI fragmenten izoláltuk a pNID6 plazmidból, amely egy 7.2 kb BamHI fragmenten hordozza a *nodD3-syrM* régiót (Györgypál és mtsai, 1988). A kivágott *syrM* gént a pPP375 vektor BamHI-ClaI helyére klónoztuk, és az így kapott plazmidnak a pBO19 nevet adtuk. A pBR322::Tn5-Cm plazmidból izolált 1.4 kb HindIII fragmentet, amely tartalmazza a Cm<sup>R</sup> gént promoterével együtt, a pBO19 *syrM* génjének XbaI helyére ligáltuk. Az így készült pBO20 plazmiddal transzformált *E. coli* törzsből triparentális keresztezés útján, konjugációval juttattuk át a pBO20



plazmidot *S. meliloti* 1021 törzsbe. Az *S. meliloti* esetében homogenotizálásra általánosan használatos pPH1JI plazmid hordozza a *syrM* gén mutagenézisére beépített Cm<sup>R</sup> gént, ráadásul Gm rezisztens is, amely a *S. meliloti* H1a (*exoH-lacZ*), ill. H2a (*exoK-lacZ*) recipiens törzsek markere, így a mi kísérletünkhöz nem volt alkalmas. Ezért egy másik plazmidot használtunk, a pVK101-et. Ebből azonban el kellett távolítani a Tc<sup>R</sup> gént egy SmaI fragment deletálásával, mivel a pBO20 is Tc rezisztens volt. A módosított pVK101 deléciós származékot (pBO7) ezután konjugációval bejuttattuk *S. meliloti* 1021(pBO20) törzsbe, majd szelektáltunk a *syrM::Cm<sup>R</sup>* konstrukciót már a genomjukban hordozó klónokra (*S. meliloti* OB81). A *syrM::Cm<sup>R</sup>* régiót transzdukcióval, M12 fág segítségével juttattuk be *S. meliloti* 8272, H1a ill. H2a törzsekbe, melynek eredményeként az *exoP::phoA*, *exoK-lacZ* illetve *exoH-lacZ* fúziót hordozó baktériumok *syrM* mutánsok lettek (*S. meliloti* OB84, 83, ill. 82 törzsek). A *syrM::Cm<sup>R</sup>* régió genomba való beépülését Southern hibridizációval, illetve polimeráz láncreakcióval (PCR) ellenőriztük a következő primerek felhasználásával: 5'-TATCGGCACATTACTCAAGC-3', és 5'-TTCGCCACGCAGCCAGCGATGC-3'.

#### 4.1.6. Az *exoK* ill. *exoP* gének lehetséges szerepének vizsgálata a két EPSI forma (LMW-HMW) arányának kialakításában *syrM* mutáns háttérben

A *syrM* mutánsban nitrogénéhezés mellett tapasztalható LMW forma, illetve nitrogén jelenlétében megfigyelhető HMW forma felhalmozódás magyarázata lehet az ExoK endoglükánázt kódoló gén, valamint a polimerizációért felelős ExoP fehérjét kódoló gén megnövekedett expressziója, ezért megvizsgáltuk a kifejeződésüket *syrM* mutáns háttérben.

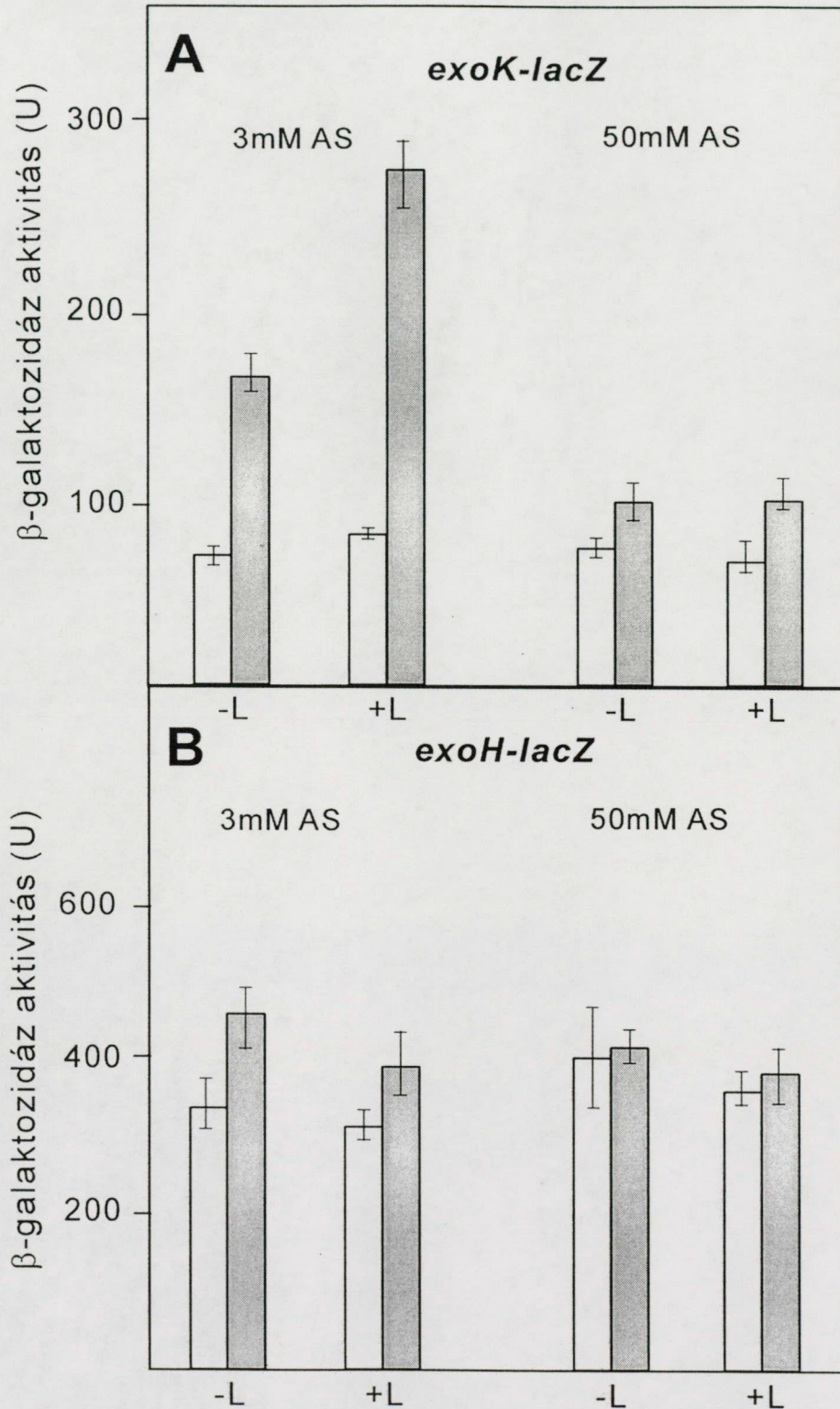
A *exoP::phoA*, *exoK-lacZ* illetve *exoH-lacZ* genomi fúziókat tartalmazó *syrM* mutáns törzseket (*S. meliloti* OB84, 83, 82) a négyféle táptalajban (kötött nitrogén ill. luteolin hiánya vagy jelenléte) felnövesztettük, majd alkalikus foszfatáz és  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás méréssel meghatároztuk a vizsgált gének expresszióját.

Alacsony (3mM) ammónium szulfát koncentrációjú táptalajban az *exoK* gén kifejeződése két-háromszor akkora volt *syrM* mutáns háttérben, mint a vad törzsben, magas kötött nitrogén tartalmú (50mM) táptalajban azonban csak 30-50 százalékkal volt több a vad törzsben detektálható értékeknél (9. ábra A).

Annak eldöntésére, hogy vajon ez a hatás az *exoK* gén előtt található gyenge promóter, vagy az operon első tagját képező *exoH* gén előtti erős promóter szabályozásán keresztül érvényesül-e, az *exoH* gén transzkripciójának mértékét is megmértük *syrM* mutáns háttérben (*S. meliloti* OB82). Az *exoH* gén kifejeződése csak mintegy 30-40 százalékkal nőtt a vad kontrolhoz képest az alacsony nitrogén tartalmú táptalajon (9. ábra B), így feltételezhető, hogy az *exoK* gén esetében tapasztalt nagymértékű génexpresszió növekedés speciálisan az *exoK* gén előtti gyenge promóteren keresztül ható szabályozási folyamat eredménye. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a *syrM* mutánsban kötött nitrogén hiányában megfigyelhető LMW EPSI forma felhalmozódásban, és ez által a két forma arányának 10-90 százalékra (HMW-LMW) való eltolódásában az ExoK endoglukanáznak szerepe van.

Az *exoK* gén szerepének további vizsgálatának céljából elemeztük az *exoK* mutáns *S. meliloti* 8445 törzs EPSI termelését kromatográfiás módszerrel, a vad törzzsel megegyező körülmények között, melynek eredményét a 10. ábra mutatja. A nitrogén nélkül inkubált baktérium kultúra felülúszójából izolált EPSI mennyisége a fele volt a vad törzs esetében detektált mennyiségnek, és bár a mutáció az ExoK fehérje

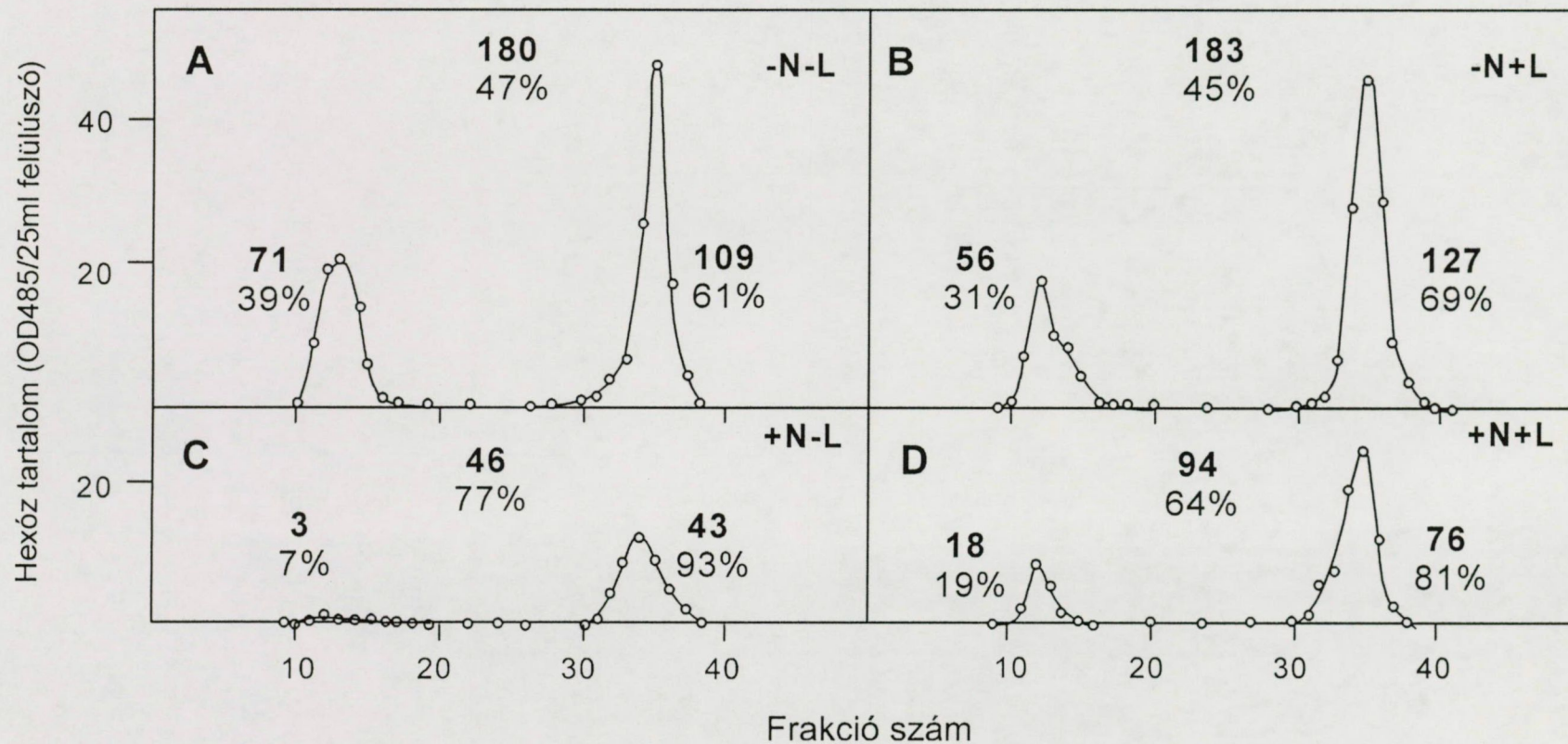
depolimerizáló funkcióját érinti, ennek ellenére a kromatográfia alapján ez a törzs nem kevesebb, hanem a vadnál 10 százalékkal több LMW formát termelt (10. ábra A-B).



9. ábra A *syrM* mutáció hatása az *exoK-lacZ* és *exoH-lacZ* fúziók kifejeződésére.

A vad háttérben mért értékeket az üres oszlopok mutatják (8. ábra adatai). A *syrM* mutánsban mért enzim aktivitások tíz (*exoK-lacZ*) és nyolc (*exoH-lacZ*) független klón párhuzamos méréseiből kapott átlagok ( $SD \leq 10\%$ , szürke oszlopok). AS: ammónium szulfát, -L és +L: luteolin hiánya vagy jelenléte a táptalajban.





**10. ábra** Az EPSI nagy (HMW) és kis (LMW) molekulatömegű formáinak megoszlása az *exoK* mutáns *S. meliloti* 8445 törzsben.

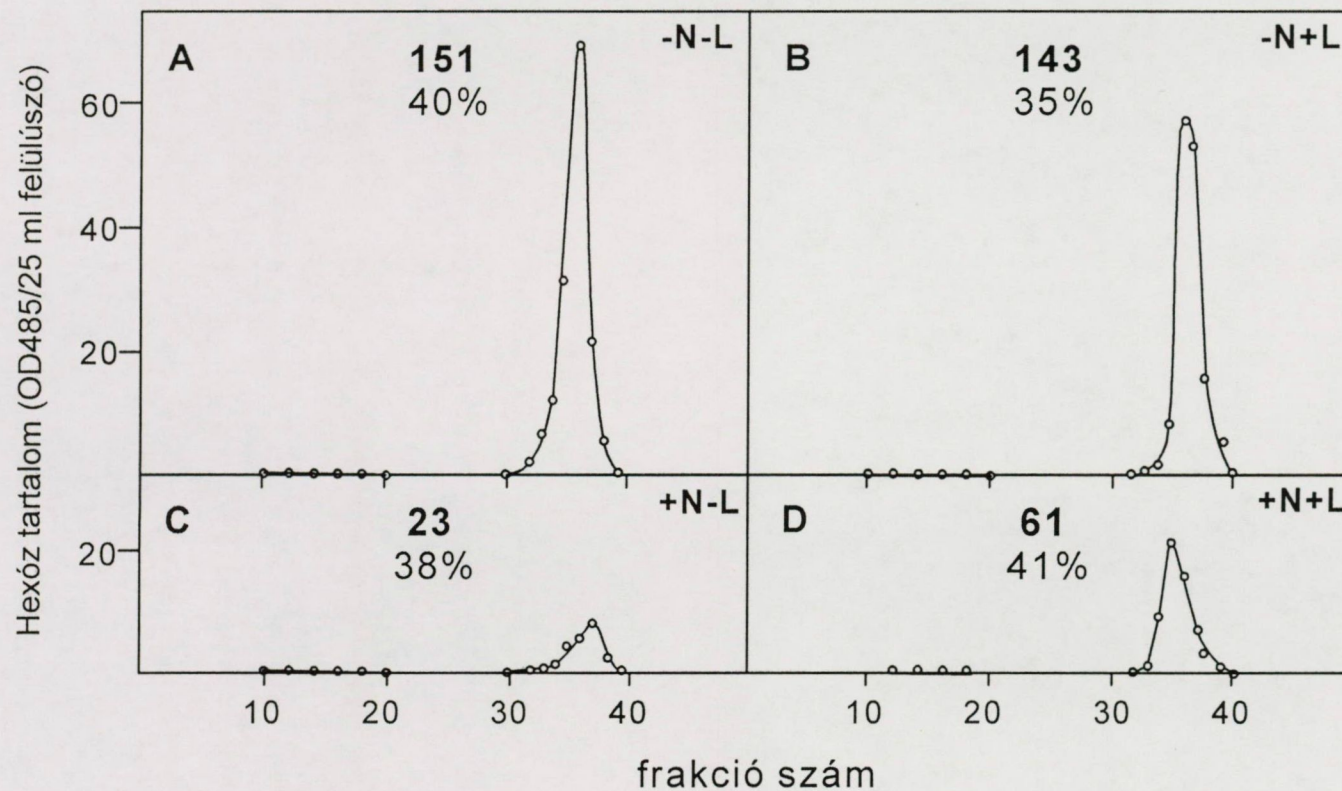
A növesztési körülmények és a mennyiségek megadása megegyezik a 6. ábránál leírtakkal. Négy független kísérletből egy kiválasztott eredményét mutatja az ábra. A totál EPSI mennyiségét jelölő számok alatti % értékek a vad baktérium esetében kapott megfelelő értékek százalékában mutatják a mutáns baktérium EPSI termelését. A csúcsok melletti % értékek a mutáns adott növesztési körülmény mellett a totál EPSI termelésének százalékában adják meg az egyes formák arányát.

Ennek több oka is lehet, egyrészt a két forma arányának kialakításában az azóta felfedezett másik, szintén endoglükánázt kódoló *exsH* gén is részt vehet (York és Walker, 1997), valamint a polimerizációt végző ExoP és ExoT enzimek aktivitása is változhatott, ami a normális egyensúly felborulásához vezethetett.

Kötött nitrogén jelenlétében az *exoK* mutáns a vad törzsnél kevesebb EPSI-t termel, de a két forma megoszlása megegyezik a vad baktérium felülúszójában tapasztalt aránnyal (10. ábra C-D). Mivel kötött nitrogén jelenlétében az *exoK* gén expressziója *syrM* mutáns háttérben megegyezett a vadban mérttel (9. ábra A), valamint az *exoK* mutánsban LMW-HMW forma termelése is a vadhoz hasonló volt (6. és 10. ábrák C-D), arra a következtetésre jutottunk, hogy nitrogén ellátottság mellett az *exoK* génnek feltehetően nincs szerepe a két EPSI forma arányának kialakításában sem a vad, sem a *syrM* mutáns baktériumban. Az *exoK* génről összefoglalásképpen elmondható, hogy szerepét nitrogén jelenlétében nem tudtuk kimutatni, míg valószínű, hogy nitrogén hiányában a *syrM* mutánsban tapasztalható LMW forma felhalmozódásban közvetlen szerepe van.

Az *exoK* gén és az *exoK* mutáns törzs vizsgálatok kapott eredmények nem magyarázták a *syrM* mutánsban nitrogén jelenlétében kimutatható HMW EPSI forma felhalmozódását, ezért feltételeztük, hogy e körülmény között más, feltehetően a polimerizációban szerepet játszó fehérjéknek lehet szerepe, ezért az *exoP* gén expresszióját és az *exoP* mutáns baktérium EPSI termelését is megvizsgáltuk.





**11. ábra** Az *exoP* mutáns (*S. meliloti* 8272) által termelt EPSI nagy (HMW) és kis (LMW) molekulatömegű formáinak kromatográfiás elválasztása. A növesztési körülmények és a mennyiségek megadása megegyezik a 6. ábránál leírtakkal. Két független kísérletből az egyik eredményét mutatja az ábra. A totál EPSI mennyiségét jelölő számok alatti % értékek a vad baktériummal kapott megfelelő értékek százalékában mutatják a mutáns baktérium EPSI termelését.

Az ExoP feltételezett szerepének megfelelően, egyik növesztési körülmény között sem volt kimutatható a HMW forma az *exoP* mutáns (*S. meliloti* 8272) felülúszójában (11. ábra), jelezve ezzel, hogy az EPSI alegységek polimerizációja nagymértékben csökkent, bár teljesen nem szűnt meg, hiszen az LMW forma, bár kisebb mennyiségben (vadban mérhetőhöz képest 40%), de jelen volt. Feltehetően az ExoP mellett más fehérjék is (ExoQ, ExoT) szerepet játszanak az oligomer molekulák összekapcsolásában.

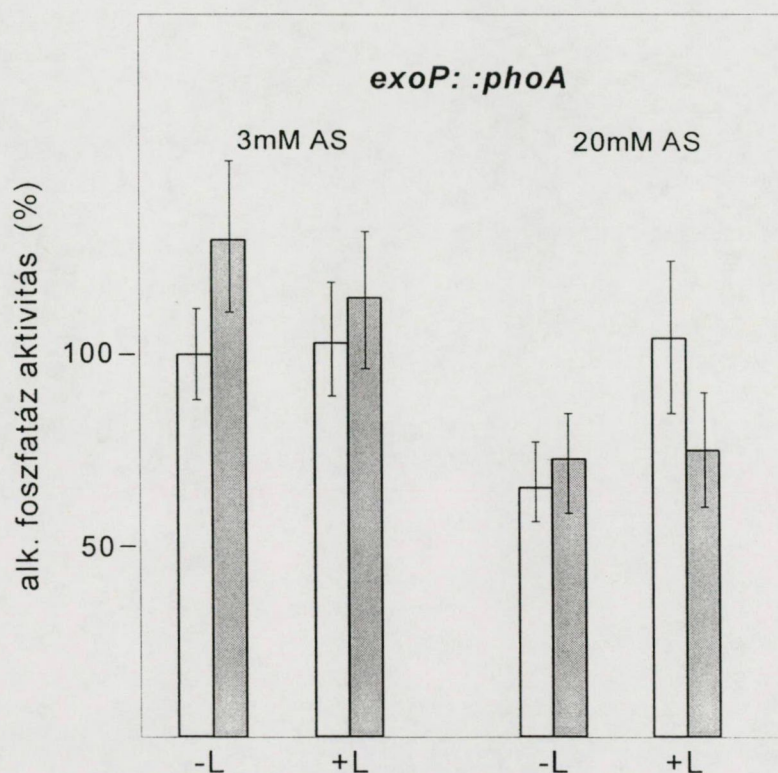
Annak eldöntésére, hogy vajon az ExoP fehérje szintjének változása okozza-e a HMW forma *syrM* mutánsban nitrogén jelenlétében tapasztalható felhalmozódását (7. ábra C-D), nyomon követtük a *exoP* gén transzkripcióját vad (*S. meliloti* 8272) ill. *syrM* mutáns (*S. meliloti* OB84) törzsekben az *exoP::phoA* fúzió alkalikus foszfatáz aktivitásának mérésével. Feltételezésünkkel ellentétben azt az eredményt kaptuk (12. ábra), hogy a nitrogén jelenlétében nem magasabb, hanem azonos (-L minták), vagy alacsonyabb (+L minták) volt az *exoP* gén expressziója a vad baktériumban mérthez képest. A csökkent expresszió feltehetőleg annak az eredménye volt, hogy *syrM* mutáns háttérben a nitrogén gátló hatása érvényesülni tudott, szemben a vad törzsben tapasztaltakkal.

Adataink alapján úgy tűnik, hogy bár a SyrM felelős lehet azért, hogy a vad baktériumban az *exoP* gén nitrogén általi repressziója elmarad luteolin jelenlétében, de ez nem ad teljes magyarázatot a *syrM* mutáns EPSI termelésében bekövetkezett változásra. Így valószínű, hogy a *syrM* mutáns által kötött nitrogén jelenlétében termelt nagyobb mennyiségű HMW forma megjelenéséért az *exoP* transzkripció szabályozásnak megváltozása nem felelős. Ez azonban nem zárja ki a lehetőségét egy esetleges fehérje szinten történő szabályozásnak, valamint annak, hogy a köztes



hosszúságú polimer formák megjelenése összefüggésben lehet a csökkent génexpresszióval.

Annak kiderítésére, hogy vajon a *SyrM* kötött nitrogén jelenléte mellett mely más *exo* gének, *Exo* fehérjék, esetleg egyéb faktorok működésének szabályozása által befolyásolja az EPSI mennyiségét, illetve minőségét, további kísérletek elvégzése szükséges.



**12. ábra** A *syrM* mutáció hatása az *exoP::phoA* fúzió kifejeződésére.

A vad háttérben mért értékeket a fehér oszlopok mutatják (8. ábra adatai). A *syrM* mutánsban mért enzim aktivitások (szürke oszlopok) 11 független klón párhuzamos méréseiből kapott átlagok, a nitrogén limitált és luteolin mentes táptalajon mért vad értékek százalékában ábrázolva. 100% *exoP::phoA* aktivitás =  $59 \pm 12 \cdot 1000 \times OD_{420} / OD_{600} \times \text{ml} \times \text{min}$ . AS: ammónium szulfát. -L ill. +L: luteolin nélkül vagy jelenlétében nőtt baktériumok.



#### 4.2. A *Sinorhizobium meliloti* 399 törzs szimbiotikus hatékonyságának vizsgálata

Dolgozatom második felében a *nod* gének nitrogén szabályozásában szerepet játszó *ntrR* génben mutációt hordozó *S. meliloti* 399 törzsnek a szimbiotikus nitrogénkötés hatékonyságára kifejtett hatásának vizsgálatát ismertetem.

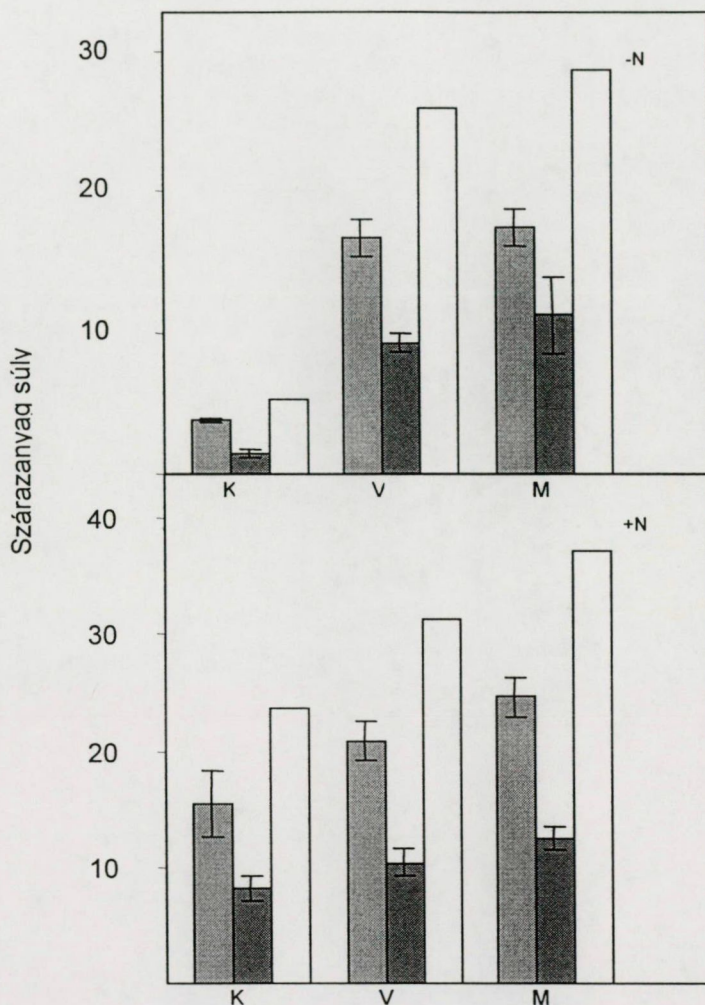
Az *S. meliloti* 399 törzs izolálása egy Tn5 mutagenézis eredménye volt, amelyben csoportunk olyan gének keresését tűzte ki célul, melyek szerepet játszanak a Nod faktor termeléséért felelős fehérjéket kódoló *nodABC* operon működésének kötött nitrogén általi gátlásában. Az *S. meliloti* 399 törzsben a *nodABC* gének transzkripciója még a táptalaj magas nitrogén (ammónium szulfát) tartalma mellett is magas volt, jelezve, hogy a mutáció feltehetően egy olyan gént érint, amely terméke részt vesz a nitrogén általi represszióban.

##### 4.2.1. A *Sinorhizobium meliloti* 399 törzs szimbiotikus fenotípusa

A Tn5 inszerciót hordozó *ntrR* gént tartalmazó *S. meliloti* 399 törzset a következő tulajdonságok jellemzik. A csoportunk korábbi kísérleteiben (Dusha és mtsai, 1989) kimutatták, hogy a vad törzshöz képest az *ntrR* mutáns mindkét növesztési körülmény mellett (nitrogénmentes, ill. 2mM ammónium szulfát tartalmú táptalajon) egy-két nappal korábban, és nagyobb számban indukál gümőket a gazdanövény gyökerén, amely különbség kötött nitrogén jelenlétében még kifejezettebb.

Önmagában a magasabb gümőszám azonban még nem jelent hatékonyabb szimbiózist is, hiszen pl. számos Fix<sup>-</sup> fenotípusú baktérium törzs által indukált gümőben vagy nincs, vagy csak csökkent mértékű nitrogénkötés folyik. Annak eldöntésére, hogy vajon az *ntrR* mutáns esetében a magasabb gümőszám együtt jár-e hatékonyabb szimbiózissal is,

növényi tesztben meghatároztuk a növények szárazanyag súlyát, valamint fajlagos nitrogéntartalmát is.



**13. ábra** Vad és *ntrR* mutáns *S. meliloti* baktérium törzsszel fertőzött lucerna növények szárazanyag súlya. A növények nitrogénmentes (felső ábra), vagy 2mM ammónium szulfát tartalmú táptalajon (alsó ábra) nőttek. K: fertőzetlen, V: vad baktériummal, ill. M: mutáns baktériummal fertőzött növények. Az oszlopok a levél (világos szürke), szár (sötét szürke) valamint az egész hajtás (fehér) szárazanyag súlyát mutatják.

Nitrogén nélküli táptalajon a levélszám azonos volt a kétféle baktériummal fertőzött növényeken, azonban a mutáns baktériummal fertőzött növények levél és szár szárazanyag súlya 4 ill. 21 százalékkal, a teljes hajtás szárazanyag súlya pedig 10 százalékkal magasabb volt a vad baktériummal fertőzöttekhez képest (13. ábra).

A 2 mM ammónium szulfát tartalmú táptalajon növesztett növények között még nagyobb különbséget lehetett kimutatni. A levél és szár szárazanyag súly 18 ill. 20 százalékkal nőtt, és a levélszámban is 10 százalékos növekedés mutatkozott a mutáns baktériumokkal fertőzött növényeknél (13. ábra).

A fajlagos nitrogéntartalomban nitrogénmentes táptalajon 9 százalékos, míg nitrogén ellátottság mellett 24 százalékos növekedést tapasztaltunk a mutánssal fertőzött növények javára.

Az *ntrR* mutáns baktérium tehát a kísérlet körülményei között hatékonyabb szimbiózist volt képes kialakítani a gazdanövénnel, és ez az előnye még kifejezettebb volt a szimbiotikus nitrogénkötésre nézve gátló ammóniumion jelenlétében.

#### 4.2.2. Az *ntrR* mutáció hatása a *nifA* és *nifH* gének kifejeződésére szimbiózisban

A növényi tesztben tapasztalható nagyobb szimbiotikus hatékonyság egyik lehetséges magyarázata a több gümő keletkezése mellett, az *ntrR* mutáns bakteroidok nagyobb nitrogénkötési képessége, amelyre a velük fertőzött növények magasabb fajlagos nitrogén tartalma is utal. A baktériumok esetleges megnövekedett nitrogénkötési képességének vizsgálatára jó lehetőséget nyújt a nitrogenáz enzimkomplex egyik alegységét kódoló *nifH* gén transzkripciójának követése vad, ill. mutáns bakteroidokban.

Kötött nitrogén hiányában ill. jelenlétében (2 mM ammónium szulfát) növesztett lucerna csíranövényeket olyan vad és *ntrR* mutáns törzsekkel fertőztük, amelyekbe előzőleg konjugáció segítségével bejutattunk egy *nifH-lacZ* fúziót hordozó plazmidot. A fertőzéstől számított 9. és 11. nap közötti időszakban, amikor a nitrogenáz enzimkomplex egységeit kódoló gének transzkripciója a nulláról maximum szintre

emelkedik, valamint a nitrogénáz enzimkomplex működésbe lép, a növényekről naponta gümőket szedtünk, és meghatároztuk a  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitását.

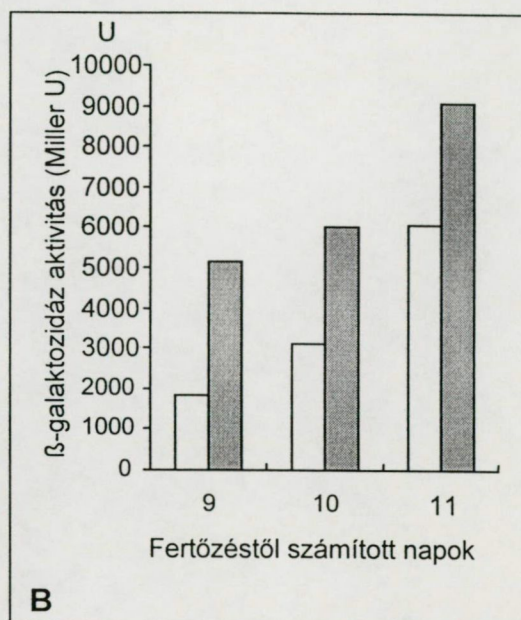
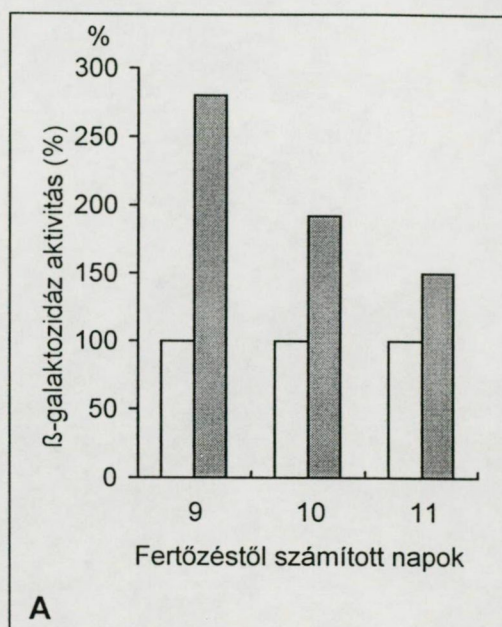
Mutáns háttérben a *nifH* gén mindkét növesztési körülmény között magasabb expressziót mutatott a vad bakteroidokban mérhető értékekhez képest (14. ábra). Nitrogén hiányában a *nifH* transzkripció mindkét típusú bakteroidban magas volt, és nagymértékű emelkedést mutatott a vizsgált időszakban, megfelelően a nitrogénkötés beindulásának (14. ábra A-B). Külső nitrogénforrás jelenlétében jóval alacsonyabb, mintegy egytizednyi transzkripciós szintet tapasztaltunk a nitrogén nélkül nőtt mintákhoz képest, amely a nitrogénkötés ilyen körülmények közötti repressziójára utal (14. ábra C-D).

Az expresszió abszolút értékének jelentős csökkenése mellett a másik lényeges megfigyelés, hogy a vad bakteroidokban stagnáló értékeket kaptunk az egymás utáni napokon mért adatoknál (14. ábra D), ezzel szemben a mutánsban a génexpresszió további növekedése figyelhető meg az idő előrehaladtával. Ez azt eredményezte, hogy a kétféle bakteroidban a *nifH* transzkripció különbsége növekedett (14. ábra C).

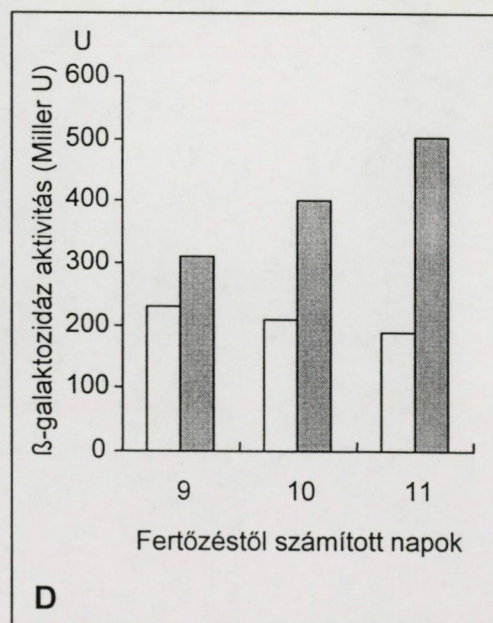
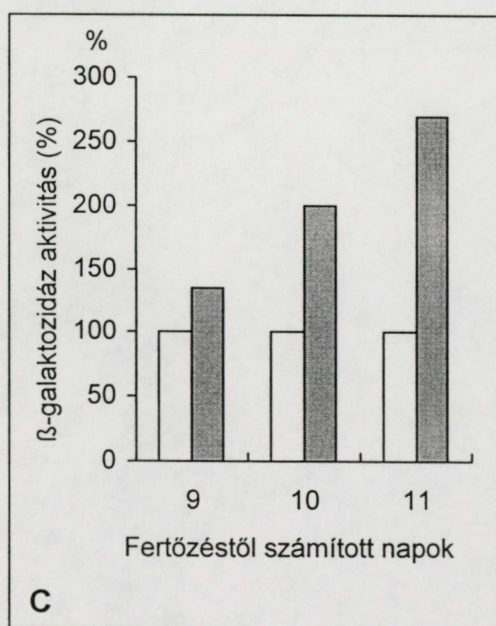
A mutáns bakteroidban tapasztalható magasabb *nifH* expresszió, valamint az a tény, hogy még külső nitrogénforrás jelenlétében is megfigyelhető volt a gén transzkripciójának növekedése, nagyobb nitrogénkötési képességre, valamint arra utal, hogy a mutáns baktériumban kevésbé tud érvényesülni az exogén nitrogén jelenlétének gátló hatása. Ezek az adatok magyarázatul szolgálhatnak az *ntrR* mutáns baktériumok által fertőzött növények szárazanyag súlyában és fajlagos nitrogén tartalmában bekövetkezett emelkedésre.



-N



+N



**14. ábra** A *nifH-lacZ* fúzió kifejeződése *ntrR* mutáns, valamint vad baktériumokkal fertőzött lucerna gyökérgümőkben.

A növényeket nitrogénmentes (A és B) és 2mM ammónium szulfát (C és D) tartalmú táptalajon növesztettük. Az ábra négy független növényi tesztből egy kiválasztott adatait mutatja. **A és C grafikon:** az *ntrR* háttérben kapott β-galaktozidáz aktivitások (szürke oszlop) a vad háttérben mért értékek (üres oszlop) százalékában; **B és D grafikon:** a β-galaktozidáz aktivitások Miller egységben ábrázolva.

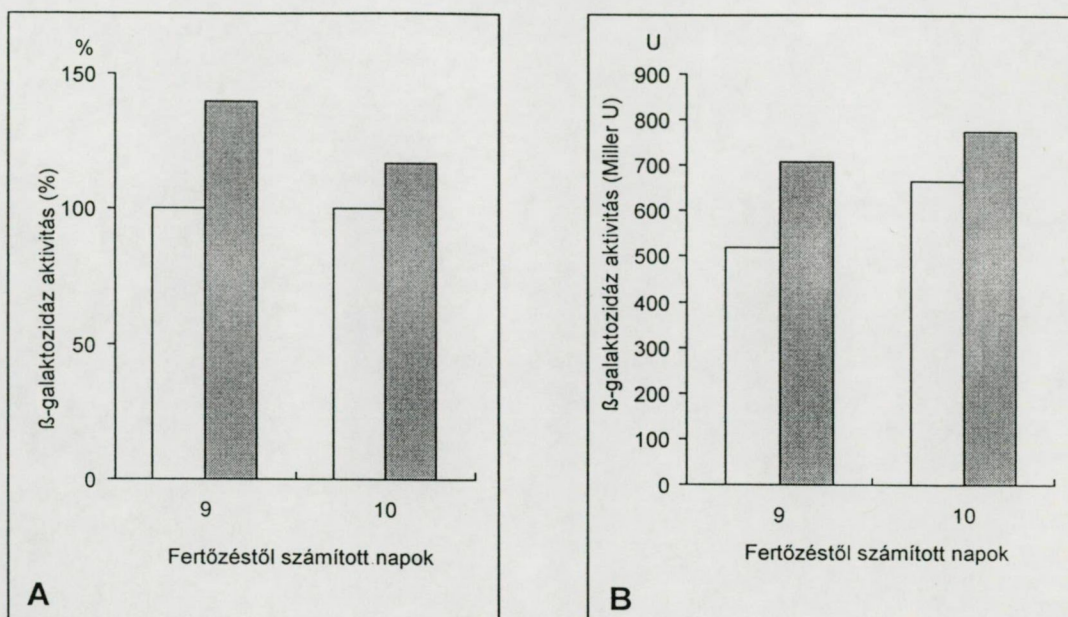
*S. meliloti*ban a nitrogénáz enzim komplexet kódoló *nif* operon pozitív regulátora a NifA fehérje, amely alacsony oxigén koncentráció mellett biztosítja az operon kifejeződését. Ezért annak eldöntésére, hogy vajon az *ntrR* mutáció is e regulátoron keresztül fejti-e ki hatását a *nif* operon transzkripciójára, a *nifA-lacZ* konstrukció kifejeződését is megmértük a *nifH-lacZ* fúzió vizsgálatával megegyező kísérleti rendszerben.

A  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitásának változása hasonló volt a *nifH* gén vizsgálatakor tapasztaltakkal. Mutáns háttérben a *nifA* gén is mindkét növesztési körülmény között magasabb mértékben fejeződött ki, bár a különbségek kisebbek voltak a *nifH* esetében tapasztaltakhoz képest (15. ábra). A nitrogén nélküli táptalajon nőtt növények gümőiben ebben az esetben is megfigyelhető volt a gén expressziójának növekedése mindkét bakteroidban (15. ábra A-B). Külső nitrogén forrás jelenlétében az aktivitások abszolút értéke a felére csökkent (15. ábra C-D), valamint a vad törzsben a génexpresszió közel azonos értékeket mutatott a különböző napokon, míg a mutánsban a *nifA* transzkripciója a *nifH* génhez hasonlóan növekedett.

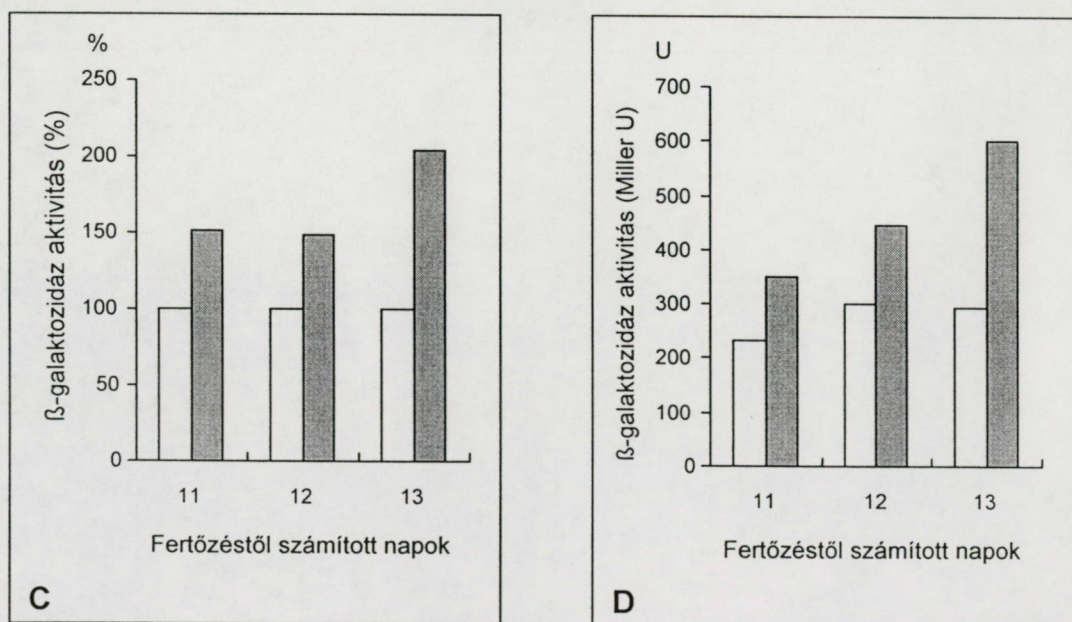
Ezek az adatok arra utalnak, hogy, az NtrR fehérje feltehetően a NifA regulátoron keresztül fejti ki hatását a nitrogénkötésre. Jelenleg is folynak a kísérletek annak tisztázására, hogy vajon a *nif* operon szabályozási kaszkád rendszerében a NifA fehérje felett álló regulátorok érintettek-e az NtrR általi represszió közvetítésében.



-N



+N



**15. ábra** A *nifA-lacZ* fúzió kifejeződése *ntrR* mutáns, valamint vad baktériumokkal fertőzött lucerna gümőben.

A növényeket nitrogénmentes (A és B) és 2mM ammónium szulfát (C és D) táptalajon növesztettük. Az ábra négy független növényi tesztből egy kiválasztott adatait mutatja. **A és C grafikon:** az *ntrR* háttérben kapott β-galaktozidáz aktivitások (szürke oszlop) a vad háttérben mért értékek (üres oszlop) százalékában; **B és D grafikon:** a β-galaktozidáz aktivitások Miller egységben ábrázolva. A mintaszedés napjai eltérőek voltak, mert a nitrogén tartalmú táptalajon később indult be a gümőzés.

#### 4.2.3. Az *ntrR* mutáns baktériumok által indukált lucerna gümők nitrogén metabolizmusa

Az *ntrR* mutánsok nagyobb nitrogénkötő kapacitása, valamint az általuk fertőzött növények magasabb fajlagos nitrogén szintje megnövekedett nitrogén asszimilációt és/vagy transzportot feltételez a gümőben. Annak a lehetőségnek az ellenőrzésére, hogy ez indukálja-e az ezekért a folyamatokért felelős fehérjéket kódoló gének magasabb transzkripcióját, megvizsgáltuk lucerna gümőben az ammónia asszimilációs folyamat első lépéseit katalizáló enzimeket (GS, NADH-GOGAT, AAT-2) kódoló gének transzkripció szintjét.

Ezeknek a növényi géneknek a működése a baktériummal való fertőzés utáni 6-7. napon kezdődik, és a 13-19. nap között éri el maximumát. Így transzkripciójuk vizsgálatát a fertőzéstől számított 9. és 12. napon leszedett gümők RNS mintáiból végeztük el RT-PCR módszer segítségével, mind nitrogén nélküli táptalajon, mind 2mM ammónium szulfát jelenlétében nőtt növényeket felhasználva.

A vad és mutáns baktériummal indukált gümőből kapott eredményeket összehasonlítva, egyik növesztési körülmény között sem kaptunk különbséget a gének transzkripciójának mértékében. A külső nitrogén forrás jelenlétének gátló hatása azonban ebben az esetben is kimutatható volt, mivel mindkét típusú gümőben mintegy harmadára csökkent a három vizsgált gén kifejeződése, amely arra utal, hogy a nitrogénkötéshez hasonlóan, a növény ammónia asszimilációs útja is nitrogén kontrol alatt áll.

Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a lucerna nitrogén asszimilációs útja nem transzkripció szinten reagál az *ntrR* mutáns által előállított ammónia többletre. Ez természetesen nem zárja ki a post transzkripció vagy post-transzláció szabályozás



lehetőségét, valamint azt, hogy transzkripciójuk olyan nagy mértékű, amely még elegendő a mutáns által előállított ammónia többlet feldolgozásához.

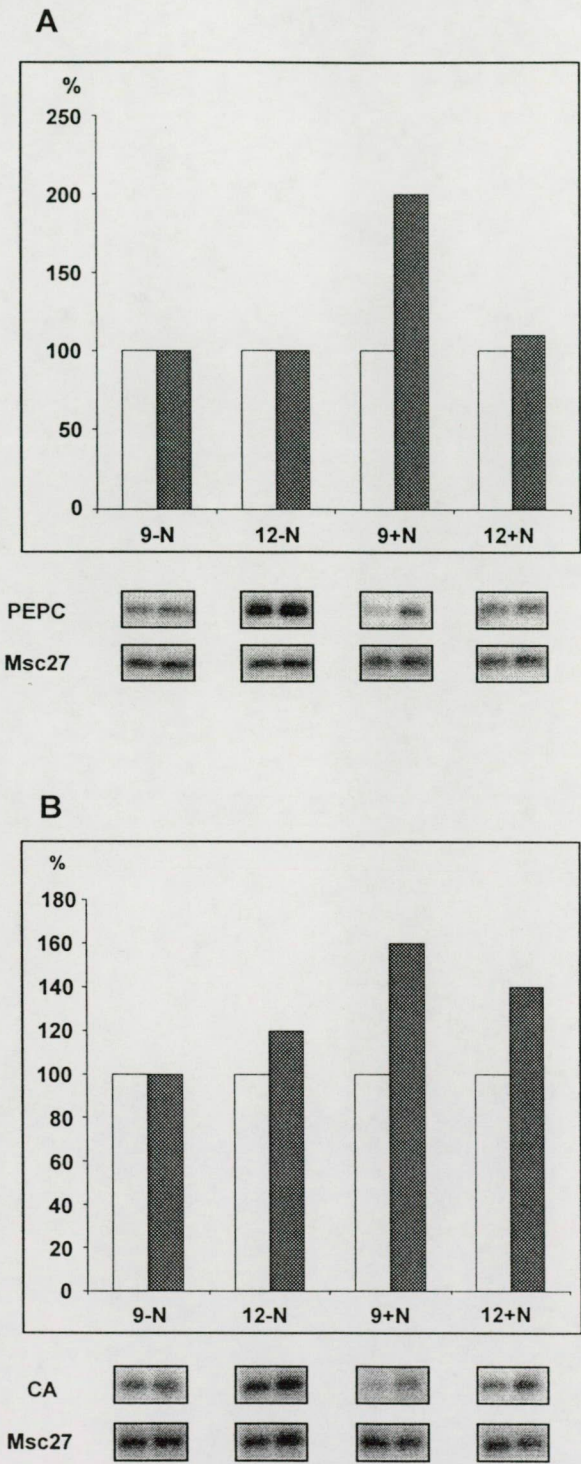
#### 4.2.4. Szén metabolizmus az *ntrR* mutáns baktériummal indukált gümőkben

A bakteroid fő energia forrása a malát, amelyet a gazdanövény biztosít számára. A megnövekedett nitrogénkötés maga után vonja a bakteroid szén- és energia igényének növekedését is, amely a malát szintézisében résztvevő növényi gének transzkripciójának emelkedését válthatja ki. Ennek igazolására, az előző pontban leírtakhoz hasonlóan, a fertőzéstől számított 9. és 12. napon gyűjtött gümőkben nyert RNS minták RT-PCR vizsgálatával meghatároztuk e gének transzkripciójának mértékét is.

Az SS gén transzkripciója egyforma volt a vad típusú és a mutáns baktériummal indukált gümőkben külső nitrogénforrás jelenlétében és hiányában is. Mivel az SS expressziója nem, az MDH expressziója pedig csak igen kis mértékben változott a mutáns baktériummal indukált gümőkben, ezekről a kísérletekről nem készítettem ábrát.

Mind a négy vizsgált gén (CA, MDH, PEPC, SS) magas szinten fejeződött ki külső nitrogénforrás hiányában, amikor a bakteroid nitrogénkötése a legaktívabb. Ilyen körülmények között a CA (16. ábra B) és MDH gének expressziójának enyhe (15-25%) emelkedését tapasztaltuk a mutáns baktériummal indukált gümőkben, míg a PEPC transzkripciója nem változott (16. ábra A).

Nitrogén tartalmú táptalajon mind a vad típusú, mind a mutáns törzzsel indukált gümőkben mind a négy gén alacsonyabb mértékben fejeződött ki a nitrogénmentes táptalajon nőtt növényeknél tapasztaltakhoz képest, hasonlóan az előző pontokban ismertetett eredményekhez.



**16. ábra** Az *ntrR* mutáció és a környezet nitrogén koncentrációjának hatása a lucerna gümők PEPC és CA génjeinek kifejeződésére.

A növényeket nitrogénmentes (-N) és 2mM ammónium szulfát tartalmú (+N) táptalajon növesztettük. A gének kifejeződését a fertőzéstől számított 9. és 12. napon leszedett gümőkől határoztuk meg. Az *ntrR* háttérben kapott expressziós adatokat (szürke oszlop) az azonos időpontban és növesztési körülmény között vad háttérben kapott értékek (üres oszlop) százalékában ábrázoltuk. A grafikonok alatt három független növényi tesztből egy kiválasztott hibridizációs képe látható (Msc27: belső kontrol). A gének expressziójában a 9. naphoz képest a 12. napon 3-4-szeres növekedést, míg a -N mintákhoz képest a +N mintákban kb. egyharmadnyi csökkenést tapasztaltunk.

Nitrogén jelenlétében a mutáns-indukálta gümőkben az MDH gén expressziója enyhe (20-25%) növekedést mutatott. Ugyanezen körülmények között a PEPC transzkripciója a 9. napon kétszerese volt a vadban mérhető értéknek, míg a 12. napon 10 százalékkal volt több annál (16. ábra A). A CA a 9. napon 60 százalékos, a 12. napon pedig 40 százalékos növekedést mutatott a vadhoz képest. (16. ábra B).

Adatainkból arra lehet következtetni, hogy az *ntrR* mutáns bakteriodok intenzívebb nitrogénkötéséből adódó energia ill. szénforrás igényének megnövekedésére a növény malát szintézisének növelésével válaszol, a szintézis út három legfontosabb enzimét kódoló gén transzkripciójának növelése útján.

A CA gén expressziójának növekedése egyúttal jelezheti a bakteroid respirációjából származó CO<sub>2</sub> szint emelkedését is, amely megnövekedett metabolikus tevékenységre utal, és amelyet a növénynek vissza kell forgatnia az anyagcsere utakba. Természetesen nem kizárt, hogy a transzkripció mértékének megváltozása mellett más szabályozási folyamatok is szerepet játszanak az *ntrR* mutáns megnövekedett dikarbonsav igényének kielégítésében.

## 5. MEGVITATÁS

Dolgozatomban a gümőképzés környezeti nitrogén szint általi szabályozásában részt vevő két *S. meliloti* gén, a *syrM* és az *ntrR* szerepét vizsgáltam a szimbiózis későbbi folyamataiban. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az eddig ismert feladatuk mellett, a *syrM* az EPSI szintézis, míg az *ntrR* a nitrogénkötés exogén nitrogén általi regulációjának közvetítésében is szerepet játszik.

### 5.1. A *syrM* gén részt vesz az *S. meliloti* 1021 törzs EPSI termelésének mind a nitrogén, mind a luteolin általi szabályozásában

#### 5.1.1. Az exopoliszacharid szintézise, valamint egyes *exo* gének kifejeződése nitrogén kontrol alatt áll

Az ammóniának az EPSI termelésre gyakorolt gátló hatását már korábban is kimutatták (Leigh és mtsai, 1985). Nitrogén éheztetés mellett 5-20-szoros növekedést lehetett kimutatni az EPSI mennyiségében (Doherty és mtsai, 1988; Reed és mtsai, 1991a; Reed és Walker 1991b), míg az EPSII termelését ugyanez a körülmény nem indukálta (Zhan és mtsai, 1991).

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy két *exo* gén, az *exoF* és *exoP* transzkripciója nitrogén szabályozás alatt áll, ugyanakkor az *exoK* és *exoH* gének a nitrogén koncentrációjától függetlenül működnek. Adataink alapján feltételezhető, hogy a Nod faktor szintézis nitrogén általi szabályozásában részt vevő *syrM* gén szerepet játszik az EPSI termelés regulációjában is. Nitrogén hiányában a *syrM* mutáns baktériumok felülúszójában kevesebb poliszacharid detektálható. Ez a megfigyelés megegyezik Barnett és mtsai (1998) eredményeivel, akik kimutatták, hogy a *syrM* által aktivált *syrA*

gén befolyásolja az EPSI mennyiségét, azonban génexpresszió szinten nem vizsgálták a jelenséget.

### 5.1.2. A kötött nitrogén koncentrációja befolyásolja a nagy (HMW) és a kis (LMW) molekulatömegű EPSI formák arányát, amely folyamatban részt vesz a *syrM* gén is

A vad típusú *S. meliloti* 1021 által nitrogén éheztetés mellett szintetizált EPSI HMW és LMW formáinak aránya 60 és 40%, mely jól egyezik irodalmi adatokkal (Becker és mtsai, 1995). A táptalaj nitrogén tartalmának növelése nem csak az EPSI mennyiségének 15 százalékra csökkenését eredményezi, hanem a HMW-LMW arány 14-86 százalékra változását is, azaz a nitrogén jelenléte az LMW forma részarányának növekedését okozza. Az a feltételezés valószínűleg kizárható, miszerint az LMW forma arányának növekedése a nagyobb ozmolaritáshoz való adaptáció eredménye. Breedveld és mtsai (1990) ugyanis kimutatták, hogy az ozmotikus nyomás növelése (200 mM NaCl) megnövekedett szukcinoglukán szintézist, valamint a HMW forma felhalmozódását eredményezi. Ezzel szemben 20 mM ammónium szulfát jelenlétében az EPSI mennyiségének csökkenése és az LMW forma akkumulációja tapasztalható. Ezeket az eredményeket magyarázhatja a Reed és mtsai (1991a) által javasolt elmélet, miszerint a nitrogén jelenléte nem csak a képződött poliszacharid mennyiségét csökkenti, hanem az egész bioszintetikus útra, ezen belül a polimerizációs aktivitásra is hatással van, ami a kevésbé polimerizálódott LMW forma arányának megnövekedését segíti elő.

Kísérleteinkben a működőképes *syrM* hiányában mind az EPSI mennyisége, mind pedig a két forma aránya megváltozott. A vadhoz viszonyítva nitrogén hiányában kevesebb, míg jelenlétében több EPSI termelődött, ráadásul a két fő forma aránya is ellenkező volt: magas ammónium szulfát koncentráció mellett a HMW



forma, míg nitrogénmentes táptalajon az LMW forma halmozódott fel. Az utóbbi esetben megfigyelhető LMW akkumuláció nem magyarázható csupán a bioszintetikus folyamatok nagymértékű csökkenésével, és az ebből adódó LMW szintézis előtérbe kerülésével, mint ahogy azt Reed és mtsai (1991a) javasolják, hiszen az EPSI mennyisége csak 65 százalékra csökkent a vad esetében detektálhatóhoz képest. Feltételezhető tehát, hogy ebben az esetben létezik más, az LMW forma arányának növekedését okozó folyamat is, mint például a polimerizáció alacsonyabb szintje, vagy a kialakult HMW forma depolimerizációja.

### **5.1.3. Nitrogén éheztetés mellett a *syrM* mutáció az *exoK* gén kifejeződésének emelkedéséhez vezet**

A szukcinoglükán polimerek méretének meghatározásában több gén is részt vehet. Annak eldöntésére, hogy a *syrM* gén regulálja-e ezeket a géneket, valamint hogy az esetleges eltérő szabályozásuk magyarázza-e az EPSI-nek a mutánsban tapasztalt méretbeli eloszlását, megvizsgáltuk az *exoK* és *exoP* gének transzkripcióját *syrM* mutáns háttérben.

Nitrogénmentes táptalajban az *exoK* expressziója két- háromszorosára nőtt a vadban mérthez képest, amely magyarázatul szolgálhat az LMW formának a *syrM* mutánsban ilyen körülmények között megfigyelhető felhalmozódására. A *syrM* feltehetően az *exoK* gén előtti gyenge promóteren keresztül fejti ki hatását az *exoK* transzkripciójára. Kontrolként ugyanis az *exoH* expresszióját is megvizsgáltuk *syrM* mutáns háttérben, és csak 25-35 százalékos növekedést tapasztaltunk, amelyből arra következtettünk, hogy az *exoH* előtti erős promóter, amely részben felelős az *exoK* átíródásáért is, nem áll a *syrM* szabályozása alatt. Eredményeinket alátámasztják Urzanqui és Walker (1992) adatai is. Amennyiben az *exoHKL* régiót hordozó plazmidot

bejuttatták vad *S. meliloti* 1021 törzsbe, az LMW forma szintézise háromszorosára növekedett a vadban detektálható mértékhez képest. Tn5 mutagenézissel kimutatták, hogy a fokozott LMW termelődés a nagyobb számú *exoK* gén jelenlétének eredménye. Bár az *exoH* mutáns baktérium nem termel LMW formát (Leigh és Lee, 1988), ezt feltehetően nem az *exoH* mutáció *exoK* expresszióra gyakorolt poláris hatása okozza, hanem az, hogy a szukcinálás hiányában az ExoK kevésbé hatékonyan tudja a polimert elhasítani (York és Walker, 1998).

Úgy gondoljuk, hogy az *exoK* gén több kópiában való jelenléte, vagy nitrogénmentes táptalajon a *syrM* mutáció hatására bekövetkező magasabb expressziója felelős a két kísérletben a baktériumok felülúszójában kimutatható több LMW molekuláért.

A *syrM* mutánsban nitrogén jelenlétében szintetizálódó kevesebb LMW forma nem az *exoK* nitrogén repressziójának következménye, hiszen e növesztési körülmény mellett a gén expressziója azonos a vad és *syrM* háttérben. Mivel a vad törzsben is független az *exoK* transzkripciója a nitrogén jelenlététől, valószínű, hogy a vad baktériumban nitrogén jelenlétekor tapasztalható megnövekedett LMW arány sem az *exoK* magasabb szintű expressziójának eredménye, hanem feltehetően más faktorok játszanak szerepet a megváltozott eloszlás kialakulásában.

Kísérleteinkben az *exoK* transzkripciója nem mutatott változást nitrogén jelenlétében, így azt feltételezzük, hogy ilyen növesztési körülmények között nem ez a gén felelős az LMW és HMW forma arányának megváltozásáért sem a vad, sem a mutáns baktériumban.

Ezért megvizsgáltuk a polimerizációban részt vevő fehérjét kódoló *exoP* gén esetleges szerepét is. Az *exoP* gén vizsgálatakor azonban kiderült, hogy a vadban mérthez hasonló szinten fejeződik ki mutáns háttérben is, kivéve a +N+L körülményt, ahol expressziója csökken, azaz szemben a vad háttérrel, a *syrM* mutánsban

érvényesülni tud a nitrogén represszálo hatása. Ez azonban nem ad magyarázatot a *syrM* mutáns EPSI fenotípusára.

Az ExoP fehérje mind a két molekulatömegű EPSI forma szintéziséért felelős. Irodalmi adatok alapján azt feltételezik, hogy a fehérjének két konformációja létezik, az egyik a polimerizáció folyamatát segíti elő, míg a másik a poliszacharid láncok hosszának terminációját határozza meg (Becker és mtsai, 1995b). Az EPSI polimer hosszára, akárcsak a lipopoliszacharid O-poliszacharid láncára, a lánc hossz bimodális eloszlása jellemző (Batchelor és mtsai, 1992; Bastin és mtsai, 1993; Morona és mtsai, 1995). *E. coli*, *Salmonella* és *Shigella* törzseknél ezt az eloszlást lánc hossz meghatározó fehérjék (Cld és Rol) tartják fenn, amelyek a polimerizációt végző enzimek aktivitását szabályozzák, a polimerizáló és termináló mód ki-be kapcsolásával (Batchelor és mtsai, 1991; Bastin és mtsai, 1993). A *cld* és *rol* mutációk hatására szabályozatlan lánc hossz eloszlás figyelhető meg, akár csak a *syrM* mutánsban nitrogén és lueolin jelenlétében. Ezért elképzelhető, hogy a *syrM* mutánsban az ExoP fehérje polimerizáló és termináló funkciójának megváltozása okozza a nitrogén jelenlétékor megfigyelhető szabálytalan polimerhossz eloszlást. Felmerülhet egy eddig még ismeretlen regulációs proteinnek a szerepe is, amely a SyrM hatása alatt állhat, és a Rol valamint Cld fehérjékhez hasonlóan meghatározza az ExoP funkcióját.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy a *syrM* mutánsban nitrogén jelenlétében megnövekedett és deregulált EPSI termelés feltehetően a nitrogén általi represszió hiánya, valamint az ExoP konformációjának esetleges megváltozott szabályozása miatt alakulhat ki.



#### 5.1.4. Az EPSI szintézist a luteolin is befolyásolja, feltehetően a *syrM* közreműködésével

Korábbi irodalmi adatok arra utalnak, hogy a növényi indukálószereknek, melyek a baktérium első válaszjelének termelődését váltják ki, szerepük lehet a poliszacharidok szintézisének szabályozásában is. Reuhs és mtsai (1995) kimutatták, hogy a lucerna gyökér exudátum az *S. meliloti* AK631 törzs nagy molekulatömegű kapszuláris poliszacharidjának megnövekedett szintézisét okozza. *S. fredii* esetében hasonló változás tapasztalható az EPS termelésben genistein hatására (Dunn és mtsai, 1992).

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a lucerna gazdanövény indukálószerének, a luteolinnak jelenléte mind a vad, mind a *syrM* mutáns baktériumban a szukcinoglükán termelés emelkedését eredményezi, különösen nitrogén tartalmú táptalajban. Emellett a vad baktériumban a biológiailag aktív LMW forma felhalmozódása figyelhető meg. Ebben a *syrM* génnek feltehetően szerepe lehet, hiszen a vad törzzsel szemben a mutáns nem képes a HMW-LMW arányt az LMW javára eltolni.

A luteolin hatása a génexpresszió szintjén is kimutatható. A nitrogén által szabályozott gének (*exoF*, *exoP*) transzkripciója nő luteolin jelenlétében, ellentétben a nitrogéntől függetlenül működő *exoH* és *exoK* gének transzkripciójával. Érdekes módon, a *syrM* mutáns háttérben nitrogén hiányában kimutatott *exoK* expresszió növekedés luteolin jelenlétében még kifejezettebb volt.

A baktériumban az EPSI szintézis, mely igen energiaigényes folyamat, alacsony szinten folyik. Stressz körülmények között, mint amilyen a nitrogénéhezés, vagy a környezet magas ozmolaritása, a sejtek védelme több EPS-t igényel. Adataink alapján feltételezzük, hogy a SyrM mind az EPSI szintézisnek, mind pedig a két fő forma eloszlásának szabályozásával hozzájárul az optimális mennyiség és polimer arány

kialakításához. Nitrogén hiányában a *syrM* mutáns nem képes annyi össz EPSI-et termelni (csak LMW formát), mint amennyit a vad törzs. Egyedül nitrogén és luteolin jelenlétében termel a vaddal összehasonlítható mennyiségű EPSI-et, azonban ilyen esetben úgy tűnik, hogy a HMW molekulák szintézise deregulált, vagy pedig a polimerek degradációja nő meg, és ez köztes lánchosszúságú molekulák megjelenéséhez vezet.

A szimbiotikus kapcsolat létrejötte magában foglalja az új környezethez való adaptációt, amelynek része lehet az EPSI formák eloszlásának változása is. Nitrogén tartalmú környezetben a baktérium gümőképzési képessége redukálódik, amellyel szinkronban van az EPSI mennyiségének csökkenése is. A redukált EPSI szintézis mellett az LMW forma felhalmozódása fontossá válhat a biológiai szignálfunkció megtartásához, bár önmagában az LMW forma jelenléte még nem elég a sikeres invázióhoz. A *syrM* mutáns bár több LMW EPSI-et termel induktív körülmények között, mégis késleltetett gümőképzést mutat növényi tesztben. A későbbi nodulációnak több oka is lehet: a Nod faktor szerkezetének különbsége, esetleg a *syrM* génnek további, eddig ismeretlen funkcióban való szerepe. Ezen kívül az is elképzelhető, hogy a sikeres invázióban a HMW formának is fontos szerepe van például ozmoprotektánsként, vagy a növényi védekező mechanizmusok kijátszásában.

## **5.2. Az *ntrR* mutáns *S. meliloti* 399 törzs a vad típusú törzsnél hatékonyabb szimbiózist képes kialakítani a gazdanövénnel**

### **5.2.1. Az *S. meliloti* 399 törzs szimbiotikus fenotípusa növényi tesztben**

Az *ntrR* mutáns törzs egy-két nappal korábban, valamint nagyobb számban indukál gümőt a lucerna gyökerén, és ez az előnye nitrogén ellátottság mellett még

nagyobb. Ezen felül, a mutáns törzzsel fertőzött növények szárazanyag súlya, valamint fajlagos nitrogén tartalma is magasabb, mint a vad baktériumokkal fertőzött lucernáé. Ezek az adatok azt támasztják alá, hogy az NtrR túl azon, hogy befolyásolja a nodulációt a *nodABC* gének szabályozásán keresztül, hatással lehet a szimbiózis későbbi folyamataira is.

### 5.2.2. Az *ntrR* mutáció hatására megnő a bakteroid nitrogénkötési kapacitása

A nitrogenáz enzimkomplex működéséhez speciális, alacsony oxigénnyomású környezetet igényel, mivel a MoFe kofaktor irreverzibilisen denaturálódik O<sub>2</sub> jelenlétében (Shaw és Brill, 1977), így az enzimkomplexet felépítő fehérjéket kódoló *nif* gének expressziójának elsődleges szabályozó eleme szimbiózisban az oxigén (Ditta és mtsai, 1987). Több irodalmi adat is alátámasztja azonban azt a feltételezést, hogy az oxigén szabályozó szerepe mellett a környezet kötött nitrogén tartalmának is szerepe van a szimbiózisban élő baktériumok nitrogénkötésének regulációjában, csakúgy, mint a szabadon élő nitrogénkötők esetében, ahol a nitrogénfixálás elsődleges szabályozója a nitrogén. *Medicago sativa* és *Phaseolus vulgaris* gümőjében is kimutatták, hogy az exogén nitrogén jelenléte csökkent nitrogenáz aktivitást eredményez (Vance és mtsai, 1983; Cock és mtsai, 1990). Baktérium tenyészetben mikroaerob körülmények között az ammónia, és kisebb mértékben a nitrát jelenlétében is a *nifH* és *nifA* gének expressziójának csökkenését mutatták ki Noonan és mtsai (1992). A *nifA* nitrogén általi szabályozásában a szabadon élő baktériumban, a *Klebsiella pneumoniae* törzsben az NtrC, oxigén általi szabályozásában *S. meliloti* törzsben a FixL/J rendszer mellett a FixK fehérje játszik szerepet. Noonan és mtsai (1992) úgy találták, hogy az *S. meliloti* *nif* génjeit szimbiózisban sem az NtrC, sem a FixK fehérje nem szabályozza a nitrogén koncentrációtól függően. Eredményeik alapján azt feltételezték, hogy a környezet

nitrogén szintjének szabályozó hatását, csakúgy, mint az oxigénregulációt, a FixLJ kétkomponensű szenzor/regulátor szabályozó rendszer közvetíti, feltehetően egy eddig ismeretlen intracelluláris faktor közreműködésével, amely a *nifA* működésének represszora lehet.

A fenti eredményekkel megegyezően, a mi kísérleti adataink is azt támasztják alá, hogy a nitrogénkötés szabályozó elemei közé tartozik a környezet nitrogén koncentrációja is. Ammónia jelenlétében mind a *nifH*, mind a *nifA* gén expressziójának nagymértékű csökkenését tapasztaltuk. Összehasonlítva a vad és a mutáns bakteroidban mért értékeket, a *nif* gének magasabb szinten fejeződtek ki a mutánsban mind nitrogénéheztes mellett, mind pedig nitrogén forrás jelenlétében. Ezen felül a nitrogén tartalmú táptalajon a vad típusú és mutáns bakteroidban detektálható különbség tovább nő az idő előrehaladtával. Ez annak a következménye, hogy míg a vadban stagnál a gének transzkripciója, a mutánsban, a nitrogén hiányában tapasztaltakhoz hasonlóan, a génexpresszió növekszik a napok múlásával. Így a mutáns még nitrogén gátlás mellett is megőrzi nitrogénkötési előnyét, amelyből arra lehet következtetni, hogy az NtrR részt vesz a nitrogénkötés külső nitrogénforrás általi szabályozásában.

A *nifA* gén vizsgálatakor a *nifH* génnél tapasztaltakhoz hasonló eredményeket kaptunk, ezért feltételezzük, hogy az NtrR közvetve vagy közvetlenül, a NifA regulátoron keresztül fejti ki hatását a nitrogénkötésre.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az *ntrR* mutáns a vad törzsnél hatékonyabb szimbiózist képes kialakítani a lucernával, amelyet a korábbi és hatékonyabb gümőképzés mellett nitrogénkötési kapacitásának megnövekedésével ér el.

### 5.2.3. Az *ntrR* mutáns megnövekedett nitrogénkötési kapacitásának hatása a gümő szén és nitrogén metabolizmusára

Az *ntrR* mutáns nagyobb nitrogénkötési hatékonysága ammónia többletet eredményez, melynek előállítása a bakteroid szén- és energiaforrás igényét növeli, illetve feldolgozása a növény ammónia asszimilációs folyamatait is érintheti. Kísérleteinkben e két fő reakcióút (ammónia asszimiláció és szénmetabolizmus) enzimeit kódoló gének expresszióját követtük nyomon lucerna gümőben.

Az ammónia asszimilációban részt vevő növényi gének (GS, NADH-GOGAT, AAT-2) nem mutattak különbséget a vad és a mutáns baktérium által indukált gümőben. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy ezeknek a géneknek olyan magas a transzkripciója, amely elegendő szintet biztosít az *ntrR* mutáns által termelt ammónia többlet feldolgozásához. Ez nem zárja ki a lehetőségét a transzkripciós szinten túli szabályozásnak (Carvalho és mtsai, 1997; Temple és mtsai, 1998). Másik magyarázat lehet, hogy a bakteroidok által termelt ammónia nem elsődleges induktora e gének működésének. *Medicago truncatula* és *Phaseolus vulgaris* esetében nem tapasztalták a GS gén expressziójának növekedését sem a nitrogénkötés mértékének megemelkedésekor, sem külső nitrogénforrás jelenlétekor (Cock és mtsai, 1990; Stanford és mtsai, 1993). Ezekkel a megfigyelésekkel ellentétben, szója és *Lotus corniculatus* esetében kimutatták, hogy gümőben a magasabb kötött nitrogén tartalom, míg gyökérben a külső nitrogénforrás jelenléte a GS gén magasabb szintű kifejeződéséhez vezet, amelyből arra következtettek, hogy, legalábbis ezekben a fajokban, a GS működése nitrogén szabályozás alatt áll (Hirel és mtsai, 1987; Miao és mtsai, 1991; Marsolier és mtsai, 1993). A táptalaj magas ammónium tartalma *P. vulgaris*-ban a nitrogenáz enzim aktivitásának, valamint a gümő GS gén expressziójának csökkenéséhez vezet (Cock és mtsai, 1990). Hasonló változásokat figyeltek meg a

NADH-GOGAT és AAT enzimek esetében is, amelyek aktivitása a nitrogénáz enzimkomplex aktivitását csökkentő hatásoknak (pl. nitrát jelenléte) kitett gümőkben csökken (Vance és mtsai, 1983; Egli és mtsai, 1989). Utóbbi eredményekkel megegyezően kísérleteinkben mi is azt tapasztaltuk, hogy amennyiben a táptalaj ammónium szulfátot is tartalmazott, mind a három gén expressziója mintegy harmadára csökkent le a vad és a mutáns által indukált gümőkben egyaránt, így a nitrogén gátló hatását, akár csak a *nif* gének esetében, itt is ki tudtuk mutatni.

A növény gümőjében a baktérium nitrogénkötéséhez szükséges energia- és szénforrást dikarbonsav (elsősorban malát és szukcinát) formájában a növény biztosítja (Schulze és mtsai, 1994). Kísérleteinkben mindkét növesztési körülmény mellett az MDH gén expressziójának kismértékű növekedését tapasztaltuk, emellett a mutáns által indukált gümőkben a CA és PEPC kifejeződése is másfél, kétszerese volt a vadban mérhető értékeknek, amelyből arra lehet következtetni, hogy az *ntrR* által indukált gümőkben nagyobb malát termelés folyik. Mivel a CA és PEPC gének terméke a gümőben felhalmozódó, elsősorban a baktériumok légzéséből származó CO<sub>2</sub>-t oxálecetsav szintézis útján visszaforgatja a szénanyagcsere útba, transzkripciójuk emelkedéséből nagyobb mértékű respirációra lehet következtetni, amely feltehetően a bakteroidok megnövekedett anyagcseréjének eredménye. Hasonlóan az ammónia asszimilációs génekhez, a szén metabolizmusban részt vevő gének esetében is expresszió csökkenést mutattunk ki nitrogén jelenlétében. A nitrogén gátló hatását mások adatai is megerősítik (Vance és mtsai, 1983; Egli és mtsai, 1989), akik a PEPC aktivitásának csökkenését tapasztalták a nitrogénáz enzimkomplex működését csökkentő hatásoknak (pl. nitrát jelenléte) kitett gümőkben.

A mutáns baktériumok által indukált gümőkben az *ntrR* génben bekövetkező mutáció nagyobb nitrogénkötési képességet eredményez, amely meglétét a bakteriális

*nif* gének transzkripciójának növekedése mellett alátámaszt a nagyobb mértékű nitrogénkötésből adódó megnövekedett energia- és szénforrás igényt kielégítő magasabb malát szintézis is.

#### 5.2.4. Az *S. meliloti* 399 törzs előnyös szimbiotikus tulajdonságainak mezőgazdasági jelentősége

A szimbiotikus nitrogénkötés mind gazdasági, mind mezőgazdasági szempontból jelentős folyamat, ezért hatékonyságának növelésére már számos kísérlet történt. A nitrogénkötéshez szükséges energiát fedező C<sub>4</sub>-dikarbonsav transzportért felelős *dctA* gén expressziójának megnövelése ugyan a szárazanyag súly 40 százalékos növekedését eredményezte, de a hajtás fajlagos nitrogén tartalmában nem mutatkozott különbség, ráadásul a magasabb szintű transzkripcióért felelős plazmid konstrukció antibiotikum szelekció hiányában szabadföldi körülmények között nem marad fenn a baktériumban (Rastogi és mtsai, 1992). A *dctABD* gének jelenléte több kópiában, együtt a *nifA* módosításával (konstitutív átíródás) magasabb nitrogénkötési kapacitáshoz vezet, de a pozitív hatás csak alacsony endogén *Rhizobium* populáció mellett érvényesül, azaz a genetikailag módosított baktérium törzs nem versenyképes szántóföldi kísérletekben (Bosworth és mtsai, 1994). Olyan mutációk, amelyek magasabb citokróm aa<sub>3</sub> tartalmat (Soberon és mtsai, 1989), vagy a transzkripció regulátor *syrB* expressziójának növekedését okozták (Sharypova és mtsai, 1999), a fajlagos nitrogén tartalom, és szárazanyag súly növekedéséhez vezettek, de a vad típusú törzsekkel szembeni versenyképességük nem bizonyított, mivel szabadföldi kísérleteket nem végeztek velük.

Úgy gondoljuk, hogy az *ntrR* mutáns törzs a következő tulajdonságai alapján az eddigi kísérleti megközelítésekénél jobb lehetőséget nyújt a mezőgazdasági felhasználáshoz: (a) a magasabb nitrogénkötési kapacitást eredményező *nif*



génexpresszió növekedése mellett, az *ntrR* mutációnak a *nod* génekre is pozitív hatása van, amely korábbi és hatékonyabb gümőzést eredményez, így az endogén *Rhizobium* populációval szemben a törzs versenyképes; (b) az antibiotikum szelekció hiányában instabil plazmid konstrukciókkal szemben, az *ntrR* mutáció a kromoszómán helyezkedik el; (c) a megnövekedett nitrogénkötési képesség a növények magasabb fajlagos nitrogén tartalma mellett nagyobb szárazanyag súllyal és levélszámmal is párosul; (d) az *ntrR* mutáció a szimbiózis folyamatait egyébként gátló, magas nitrogén koncentrációjú környezetben is érvényesül.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban az *S. meliloti* 1021 törzs kettő génjének, a gümőképzés környezeti nitrogén szint általi szabályozásában részt vevő *syrM* és *ntrR* géneknek esetleges szerepét vizsgáltam a szimbiózis későbbi folyamataiban. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az eddig ismert feladatuk mellett a *syrM* az EPSI szintézis, míg az *ntrR* a nitrogénkötés hatékonyságának külső nitrogén forrás általi regulációjának közvetítésében is szerepet játszik:

### 1. A *syrM* mutáció hatása az *S. meliloti* EPSI termelésére

- a vad típusú *S. meliloti* 1021 törzs EPSI szintézisének mind mennyiségét, mind minőségét meghatározza a környezet nitrogén koncentrációjának szintje, valamint a növényi indukálószer, a luteolin jelenléte is,
- az egyes, EPSI termelésben, polimerizációban illetve transzportban résztvevő reprezentatív *exo* gének (*exoF,P*) nitrogén és luteolin szabályozás alatt állnak, míg más, szerkezeti módosításban szerepet játszó gének (*exoH,K*) attól függetlenül működnek,
- a *syrM* mutáns EPSI termelésének mértéke, valamint szerkezetének összetétele is megváltozik a táptalaj nitrogén ellátottságától, illetve a luteolin jelenlététől függően, ebből következően a *syrM* gén feltehetően közreműködik az EPSI termelés nitrogén és luteolin általi regulációjának közvetítésében,
- az *exoP* és *exoK* gének a táptalaj összetételétől függően a *syrM* szabályozása alatt állnak, amely részben magyarázza a mutánsban tapasztalható EPSI megoszlást,

### 2. Az *ntrR* génben bekövetkezett mutáció hatása a szimbiózis hatékonyságára

- az *ntrR* mutáns *S. meliloti* 399 törzs nitrogénkötési képességének megnövekedése révén, melyet a *nifH* és *nifA* gének szabályozásával valósít meg, a vad típusú

baktériumnál hatékonyabb szimbiózist képes kialakítani a gazdanövénnyel, előnyös tulajdonságai alkalmassá teszik mezőgazdasági felhasználásra is,

-az *ntrR* mutáns által indukált gümőkben megnő a növény szénanyagcsere útjának enzimeit kódoló gének expressziója, amely a bakteroid megnövekedett szén- és energiaforrás igényére utal, és alátámasztja a nagyobb nitrogénkötési kapacitás tényét,

-lucerna gümőben kimutattuk a környezet kötött nitrogén tartalmának a *nif* génekre, valamint a növény szén- és nitrogén anyagcsere útjainak enzimeit kódoló génekre gyakorolt gátló hatását.

## 7. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

The formation of symbiotic nitrogen-fixing root nodules is highly specific and requires the recognition and subsequent coordinated interaction of the partners by exchanging molecules of signal function.

As the first step, the host plants release specific flavonoid compounds that activate the rhizobial nodulation (*nod*) genes. The enzymes encoded by *nod* genes are involved in the biosynthesis and transport of the lipochito-oligosaccharide Nod signal molecules (Nod factors) required for initiating nodule organogenesis (Lerouge et al., 1990). These early steps of symbiosis are under the control of fixed nitrogen. In the presence of ammonium *nod* genes are repressed, therefore, the formation of nodules on plant root is suppressed (Dusha et al., 1989).

In response to the Nod-factors, root cortical cell division is initiated, resulting in the formation of the meristem, from which the different types of nodule tissues are differentiated. Bacteria invade the nodule cells through a tubular structure, the infection thread then they differentiate into nitrogen-fixing bacteroids. For nodule infection by rhizobia additional communication between the two partners is likely to be required, where cell surface polysaccharides, such as acidic exopolysaccharides (EPS), determined by *exo*, genes are implicated (Leigh and Coplin 1992; Kannenberg and Brewin 1994). *S. meliloti* mutants deficient in EPS production induce empty nodules incapable for nitrogen fixation (Leigh et al. 1985) since bacteria are unable to penetrate the nodule tissue due to the formation of abortive infection threads (Finan et al. 1985; Leigh et al. 1987).

The acidic EPSI or succinoglycan is polymerized from octasaccharide repeating subunits containing one galactose and seven glucose residues, carrying acetyl, succinyl

and pyruvyl substituents (Åman et al. 1981). Genes required for the biosynthesis of EPSI have been identified, sequenced (Leigh et al. 1985; Long et al. 1988b; Becker et al. 1993a; 1993b; Becker et al. 1995a; Glucksmann et al. 1993a; Müller et al. 1993), and investigated for their role in the synthesis, modification, polymerization and export of EPSI (Glucksmann et al. 1993a; 1993b; Reuber and Walker 1993). EPSI is secreted in both high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) forms (Leigh and Lee 1988). The *Fix*<sup>+</sup> phenotype and the nodule invasion ability of the *exo* mutants were partially restored on alfalfa host by the addition of purified wild type LMW fraction of EPSI; however, the HMW form was inactive (Urzainqui and Walker 1992; Battisti et al. 1992).

Nitrogen starvation of *S. meliloti* result in a considerable increase of EPSI production. We have shown that the presence of nitrogen altered also the ratio of high and low molecular weight (HMW and LMW, respectively) forms of EPSI favouring the production of LMW molecules. The transcription of two *exo* genes (*exoF*, *exoP*) was found to be under the control of combined nitrogen. In contrast, *exoH* and *exoK* were expressed independently from the nitrogen level. *syrM*, a regulatory gene for the nitrogen control of *nod* gene expression was shown to be involved in the regulation of EPSI production. In a *syrM* mutant both the amount of EPSI and the ratio of the two main forms were altered compared to the wild type strain. In nitrogen-starved cultures, a reduced level of EPSI and the dominance of the LMW form was found, while in nitrogen-containing samples an increased level of EPSI and the accumulation of the HMW fraction was observed. An enhanced expression level of *exoK* gene and the higher ratio of the LMW form in nitrogen-free samples of the *syrM* mutant suggest a regulatory role for *syrM* in *exoK* expression and a contribution of *exoK* to the accumulation of the LMW form of EPSI. The increased and deregulated EPSI



production of the *syrM* mutant in the presence of nitrogen may be due to the lack of nitrogen repression and an altered regulation of ExoP conformation.

The presence of luteolin resulted in an elevated succinoglycan production both in the wild type and *syrM* mutant strains. The increase of the EPSI level was more pronounced in nitrogen-repressed cultures, moreover, an enhancement of the LMW fraction of EPSI was also observed. *syrM* is involved in the luteolin-enhanced EPSI synthesis, since contrary to the wild type strain, a mutant deficient in SyrM is not able to alter the HMW:LMW ratio in favour of the LMW form.

The effect of luteolin was also observed at the level of gene expression. Nitrogen regulated genes (*exoF* and *exoP*) exhibited an enhanced expression in the presence of luteolin, contrary to the non-regulated *exoH* and *exoK*. The higher expression level of *exoK* in the nitrogen-starved *syrM* mutant strain is further enhanced in the presence of luteolin. The expression of the *exoP* gene was not repressed by nitrogen in the presence of luteolin in the wild type cells, while in the *syrM* mutant this “escape” from nitrogen repression was not observed. The reason for the lack of nitrogen repression of *exoP* in the presence of luteolin is unknown. It seems, however, that *syrM* is also required for this function.

Previously our group has shown that due to a chromosomal mutation in the *ntrR* gene of *S. meliloti*, the nitrogen repression of *nod* genes was released. The level of *nodABC* and *nodD3* expression was higher in the mutant strain *S. meliloti* 399, and the strain formed nodules on alfalfa roots earlier and in higher number than the wild type strain, even in the presence of fixed nitrogen (2mM ammonium sulfate) (Dusha et al., 1989). These data demonstrated that in addition to the role of the host plant in the nitrogen regulation of nodule formation, the symbiotic rhizobial partner also contributes to the control of nodule initiation by adjusting the optimum number of nodules

depending on the level of fixed nitrogen. Our data also indicated, that alfalfa plants inoculated by the strain *S. meliloti* 399 developed not only higher number of nodules, but the harvested plants had higher dry weight values when compared to that of the wild type-inoculated plants. The higher dry weight production of the host plant can be due to either the higher number of nitrogen-fixing nodules, or the more efficient nitrogen fixation/ammonia assimilation, or both. Increased symbiotic efficiency would imply an effect of *ntrR* mutation on the following processes: i/ nitrogen fixation by the bacteroids, ii/ assimilation of ammonia by the plant metabolic pathways. To clarify which one of these processes could be affected, we examined the possible influence of *ntrR* mutation at two levels. The expression of bacterial *nif* genes coding for one of the subunits of the nitrogenase enzyme (*nifH*), and for its positive regulator protein (*nifA*) were studied in bacteroids formed by the mutant strain. Furthermore, the expression of plant genes involved in the assimilation and transport of symbiotically fixed nitrogen was investigated.

In the mutant bacteroids increased *nifH* transcription was observed in both the presence, or absence of combined nitrogen compared to the wild type, indicating that mutation in the *ntrR* gene resulted in elevated nitrogen fixation. The presence of exogenous combined nitrogen reduced the *nifH* transcription to significantly lower level. However, the difference in gene expressions between the wild type and the mutant bacteroids increased due to the fact that the mutant kept a considerable rate of rise in gene expressions like in nitrogen free condition, while the wild type bacteroids exhibited stagnating values. Thus, the mutants kept their advantage in nitrogen fixation capacity even under nitrogen repression. The same conclusion can be drawn from the investigation of the *nifA*, indicating that *ntrR* may affect nitrogen fixation via controlling the NifA regulator.

In plant cytoplasm the key enzymes of ammonia assimilation, glutamine synthetase (GS) and NADH-dependent glutamate synthase (NADH-GOGAT), incorporate ammonium into glutamine and glutamate very actively. In alfalfa, symbiotically fixed nitrogen is transported mainly as asparagine resulted from the precursor molecule aspartate, which synthesized by aspartate aminotransferase (AAT).

The expression of these plant genes involved in the assimilation of ammonia does not revealed any significant differences in nodules elicited by the *ntrR* mutant bacteria. One of the explanations for this observation should be the possibility that the high transcription rate of these genes in nodules is sufficient for assimilation of the elevated ammonia produced by the *ntrR* mutant bacteroids. It does not exclude the possibility of post-transcriptional or post-translational regulation of these proteins (Carvalho et al., 1997; Temple et al., 1998). The presence of exogenous ammonium decreased the expression of each plant genes involved in ammonia assimilation to about one third, presumably via decreasing the nitrogenase activity, arising the possibility of inhibition of exogenous nitrogen on the rate of nitrogen fixation and indirectly on ammonia assimilation.

During symbiosis the rate of exchange of metabolites between plant and bacteroids is closely interdependent. The high rate of fixed nitrogen production requires a high rate of carbon and energy supply from the plant to the bacteroids.

Malate, one of the primary sources of energy and carbon for nodules, is synthesized from sucrose in a multi-step reaction involving sucrose synthase (SS) phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and malate dehydrogenase (MDH) (Vance 1991). In addition to the enzymes of the metabolic pathway leading from sucrose to malate, carbonic anhydrase (CA) has an important contribution to nodule carbon metabolism (Badger et al., 1994). Due to the high respiratory activity, large amounts of

CO<sub>2</sub> are released in nodules, which are refixed through CA and PEPC activity (Vance et al., 1994). CA catalyzes the formation of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> from CO<sub>2</sub>, which represents the carbon substrate of PEPC (Hatch and Burnell, 1990).

Due to the elevated nitrogen fixation of the *ntrR* mutant bacteroids, the demand of more energy and carbon supply from alfalfa is raised. Indeed, in both growth conditions, a slight increase of the transcription of MDH indicating higher malate synthesis was observed in nodules elicited by the mutant bacteria. Furthermore, in the presence of exogenous nitrogen the expression of PEPC and CA, encoding enzymes catalyzing the synthesis of oxalacetate through refixation of CO<sub>2</sub> released by bacteroids, was increased indicating higher respiratory activity of mutant bacteroids and higher malate synthesis of nodules induced by them. The high level of expression of these genes in nitrogen free condition probably sufficient for the higher energy demand of the mutant bacteroids consequently such a difference in transcription levels can not be detected. We also found that the presence of exogenous nitrogen resulted in the decrease of expression of each examined gene.

Strain carrying mutation in the *ntrR* gene offers more reliable alternatives for agronomic application, since : (i) beyond to the increase of the expression of *nif* genes, resulted in higher nitrogen fixation capacity, mutation off the *ntrR* has also a positive effect on the *nod* genes leading to earlier and more effective nodulation, which makes this strain more competitive than endogenous rhizobia, (ii) in contrast to plasmid constructs (Rastogi et al., 1992 Maier et al., 1996), which are instable in lack of antibiotic selection pressure *ntrR* mutation located on the chromosome , (iii) the elevated nitrogen fixation capacity and the specific nitrogen content of the plants coincide with higher leaf number and dry weight matter, (iv) the *ntrR* mutation exert

positive effect on symbiosis independently from the nitrogen content of the environment.



## 8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ TARTOZÓ KÖZLEMÉNYEK

#### cikkek

Dusha, I., Oláh, B., Szegletes, Z., Erdei, L., Kondorosi, A. (1999) *syrM* is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 12:755-765.

Oláh, B., Kiss, E., Györgypál, Z., Kondorosi, Á., Dusha, I. (2000) Connection of the nitrogen and carbon metabolism of alfalfa nodules induced by the *ntrR* mutant *S. meliloti* strain. **Plant Cell** – beküldve

#### konferencia kiadványok

Dusha, I., Oláh, B., Dixon, R. (1994) Bakteriális szignál molekulák szintézisének regulációja. Magyar Genetikusok Egyesülete III. Konferenciája, Debrecen

Dusha, I., Oláh, B., Kiss, E., Kiss, P., Bottka, S., Kondorosi, A. (1996) Mutations in two nitrogen regulatory genes affect symbiotic signal production by *Rhizobium meliloti*. 2<sup>nd</sup> European Nitrogen Fixation Conference, Poznan.

Dusha, I., Kiss, E., Györgypál, Z., Oláh, B., Kondorosi, A. (1998) The efficiency of symbiosis is modulated by the nitrogen controlled nodulation and invasion functions of the bacterial partner. 3<sup>rd</sup> European Nitrogen Fixation Conference, Lunteren, The Netherlands. p. 28

Oláh, B., Dusha, I. (1999) A szimbiózis hatékonyságának modulálása a *nod* és *exo* gének expressziójának szabályozásával. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, o. 44. (előadás)

### EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

#### cikkek

Kiss, E., Mergaert, P., Oláh, B., Kereszt, A., Staehelin, C., Davies, A. E., Downie, J. A., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (1998) Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. **Mol. Plant-Microbe Interact** 11:1186-1195.

Cebolla, A., Vinardell, J. M., Kiss, E., Oláh, B., Roudier, F., Kondorosi, A., Kondorosi, E., (1999) The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. **EMBO J.** 18(16): 4476-4484.

## **konferencia kiadványok**

Kiss E., Kereszt, A., **Oláh, B.**, Downie, J. A., Kondorosi A., Kondorosi E. (1996) Negative regulation of the nodulation genes by NodR in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain TOM. 2<sup>nd</sup> European Nitrogen Fixation Conference, Poznan.

Kondorosi, E., Cebolla, A., Fehér, A., Foucher, F., Györgyey, J., Kiss, E., **Oláh, B.**, Roudier, F., Trinh, H., Vinardell, J. M., Dudits, D., Hirt, H., Kondorosi, A. (1998): Control of Nod factor-induced cell cycle activation in *Medicago* roots. in: IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, p.29.

Kondorosi, E., Cebolla, A., Foucher, F., Roudier, F., Vinardell, J. M., **Oláh, B.**, Kiss, E., Györgyey, J., Mergaert, P., Vaubert, D., Kondorosi, A. (1998) Regulation of cell cycle during nodule organogenesis. 3<sup>rd</sup> European Nitrogen Fixation Conference, Lunteren, The Netherlands. p. 23.

Charon, C., Cebolla, A., Vinardell, J. M., Kiss, E., **Oláh, B.**, Martin, C., Schultze, M., Felle, H., Kondorosi, É., Kondorosi, Á. (1999) A gyökérgümő fejlődésének szabályozása.. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, o. 45.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- Allen, O. N., Allen, E. K. (1981). The *Leguminosae*. The University of Wisconsin Press, Madison.
- Allen, N. S., Bennett, M. N., Cox, D. N., Shipley, A., Ehrhardt, D. W., Long, S. R. (1994). Effects of Nod factors on alfalfa root hair  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{H}^+$  currents and on cytoskeletal behaviour. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. M. J. Daniels, J. A. E. Osbourn, ed. (Dordrecht: Kluwer), pp. 107-113.
- Agron, P. G., Ditta, G. S., Helinski, D. R. (1993). Oxygen regulation of *nifA* transcription *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3506-3510.
- Åman, P., McNeil, M., Franzen, L., Darvill, A. G., Albersheim, P. (1981). Structural elucidation, using HPLC-MS and GLC-MS, of the acidic polysaccharide secreted by *Rhizobium meliloti* strain 1021. *Carbohydr. Res.* **95**, 263-282.
- Badger, M. R., Price, G. D. (1994). The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 369-392.
- Barnett, M., Long, S. R. (1990). DNA sequence and translational product of a new nodulation-regulatory locus: SyrM has sequence similarity to NodD proteins. *J. Bacteriol.* **172**, 3695-3700.
- Barnett, M. J., Swanson, J. A., Long, S. R. (1998). Multiple genetic controls on *Rhizobium meliloti* *syrA*, a regulator of exopolysaccharide abundance. *Genetics* **148**, 19-32.
- Bastin, D. A., Stevenson, G., Brown, P. K., Haase, A., Reeves, P. R. (1993). Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol. Microbiol.* **7**, 725-734.
- Batchelor, R. A., Haraguchi, G. E., Hull, R. A., Hull, S. I. (1991). Regulation by a novel protein of the bimodal distribution of lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 5699-5704.
- Battisti, L., Lara, J. C., Leigh, J. A. (1992). Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5625-5629.
- Batut, J., Daveran-Mingot, M. L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A. M., Kahn, D. (1989). *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*,

regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. The EMBO J. 8, 1279-1286.

- Becker, A., Kleickmann, A., Arnold, W., Pühler, A. (1993a). Analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoH/exoK/exoL* fragment: ExoK shows homology to excreted endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanases and ExoH resembles membrane proteins. Mol. Gen. Genet. 238, 145-154.
- Becker, A., Kleickmann, A., Keller, M., Arnold, W., Pühler, A. (1993b). Identification and analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoAMONP* genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and mapping of promoters located on the *exoHKLAMONP* fragment. Mol. Gen. Genet. 241, 367-379.
- Becker, A., Niehaus, K., Pühler, A. (1995). Low-molecular-weight succinoglycan is predominantly produced by *Rhizobium meliloti* strains carrying a mutated ExoP protein characterized by a periplasmic N-terminal domain and a missing C-terminal domain. Mol. Microbiol. 16, 191-203.
- Bergman, K., Gulash-Hoffe, M., Hovestadt, R. E., Larosiliere, R. C., Ronco, P. G., Su, R. (1988). Physiology of behavioral mutant of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. J. Bacteriol. 170, 3249-3254.
- Beringer, J. E., Beynon, J., Buchanan-Wollaston, A. V., Johnston, A. W. B. (1978). Transfer of drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. Nature 276, 633-634.
- Bolivar, F., Rodriguez, R., Greene, P. J., Betlach, M., Heynecker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J., Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-113.
- Bosworth, A. H., Williams, M. K., Albrecht, K. A., Kwiatkowski, R., Beynon, J., Hankinson, T. R., Ronson, C. W., Cannon, F., Wacwk, T. J., Triplett, E. W. (1994). Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression. Appl. Env. Microbiol. 60, 3815-3832.
- Boyer, H. W. Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41, 459-472.
- Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L. P. T. M., Zehnder, A. J. B. (1990). Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. J. Gen. Microbiol. 136, 2511-2519.

- Brewin, N. J. (1991). Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 191-226.
- Brickman, E., Beckwith, J. (1975). Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and  $\phi 80$  transducing phages. *J. Mol. Biol.* 96, 307-316.
- Carvalho, H., Sunkel, C., Salema, R., Cullimore, J. V. (1997). Heterometric assembly of the cytosolic glutamine synthetase polypeptides of *Medicago truncatula*: complementation of a *glnA* *Escherichia coli* mutant with a plant domain-swapped enzyme. *Plant Mol. Biol.* 35, 623-632.
- Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201, 134-139.
- Coba de la Pena, T., Frugier, F., McKhann, H. I., Bauer, P., Brown, S., Kondorosi, A., Crespi, M. (1997). A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant J.* 11, 407-420.
- Cock, J. M., Mould, R. M., Bennett, M. J., Cullimore, J. V. (1990). Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of *Phaseolus vulgaris* following changes in the ammonium supply and infection with various *Rhizobium* mutants. *Plant Mol. Biol.* 14, 549-560.
- Dakora, F. D., Joseph, C. M., Phillips, D. A. (1993). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 101, 819-824.
- David, M., Daveran, M. L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P., Kahn, D. (1988). Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* 54, 671-683.
- Denarie, J., Debelle, F., Prome, J. C. (1996). *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 503-535.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helinski, D. R. (1980). Broad host-range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7347-7351.
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A., Kim, C. H. (1987). The *nif* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.* 169, 3217-3223.



- **Doherty, D., Leigh, J. A., Glazebrook, J., Walker, G. C. (1988).** *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *Rhizobium meliloti* acidic Calcofluor-binding exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **170**, 4249-4256.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356. \
- **Dudley, M. E., Jacobs, T. W., Long, S. R. (1987).** Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta* **171**, 289-301.
- **Dunn, M. F., Pueppke, S. G., Krishnan, H. B. (1992).** The *nod* gene inducer genistein alters the composition and molecular mass distribution of extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium fredii* USDA193. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**, 107-112.
- Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., De Bruijn, F. J., Schell, J. (1989).** The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 89-96.
- Dusha, I., Kondorosi, A. (1993).** Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **240**, 435-444.
- **Dusha, I., Oláh, B., Szegletes, Z., Erdei, L., Kondorosi, A. (1999).** *syrM* is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**, 755-765.
- **Egli, M. A., Grimth, S. M., Miller, S. S., Anderson, M. A., Vance, C. P. (1989).** Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* **91**, 898-904.
- **Ehrhardt, D. W., Atkinson, E. M., Long, S. R. (1992).** Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**, 998-1000.
- Ehrhardt, D. W., Wais, R., Long, S. R. (1996).** Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**, 673-681.

- Finan, T. M., Hartweg, E., LeMieux, K., Bergman, K., Walker, G. C., Signer, E. R. (1984). General transduction in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 159, 120-124.
- Finan, T. M., Hirsch, A. M., Leigh, J. A., Johanson, E., Kuldau, G. A., Deegan, S., Walker, G. C. (1985). Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell 40, 869-877.
- Fischer, H-M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. Microbiol. Rev. 58, 352-386.
- Gantt, J. S., Larson, R. J., Farnham, M. W., Pathirana, S. M., Miller, S. S., Vance, C. P. (1992). Aspartate aminotransferase in effective and ineffective alfalfa nodules. Plant Physiol. 98, 868-878.
- Gibson, A. H., Nutman, P. S. (1960). Studies on the physiology of nodule formation. VII. A reappraisal of the effect of preplanting. Ann. Bot. 24, 420-433.
- Glazebrook, J., Walker, G. C. (1989). A novel exopolysaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Cell 56, 661-672.
- Glucksmann, M. A., Reuber, T. L., Walker, G. C. (1993a). Family of glycosyl transferases needed for the synthesis of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 175, 7033-7044.
- Glucksmann, M. A., Reuber, T. L., Walker, G. C. (1993b). Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: A model for succinoglycan biosynthesis. J. Bacteriol. 175, 7045-7055.
- González, J. E., Reuhs, B. L., Walker, G. C. (1996). Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8636-8641.
- Göttfert, M., Horváth, B., Kondorosi, É., Putnoky, P., Rodriguez-Quinones, F., Kondorosi, Á. (1986). At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J. Mol. Biol. 191, 411-420.
- Gregerson, R. G., Miller, S. S., Twary, S. N., Gantt, J. S., Vance, C. P. (1993). Molecular characterization of NADH-Dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. Plant Cell 5, 215-226.
- Gussin, G. N., Ronson, C. W., Ausubel F. M. (1986). Regulation of nitrogen fixation genes. Annu. Rev. Genet. 20, 567-591.

- Györgyei, J., Gartner, A., Nemeth, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E., Dudits, D. (1991). Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **16**, 999-1007.
- Györgypál, Z., Iyer, N., Kondorosi, A. (1988). Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 85-92.
- Györgypál, Z., Kondorosi, É., Kondorosi, Á. (1991). Diverse signal sensitivity of NodD protein homologs from narrow and broad host range rhizobia. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 356-364.
- Hatch, M. D., Burnell, J. N. (1990). Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C4 photosynthesis. *Plant Physiol.* **93**, 825-828.
- Hirel, B., Bouet, C., King, B., Layzell, D., Jacobs, F., Verma, D. P. (1987). Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J.* **6**, 1167-1171.
- Honma, M. A., Ausubel, F. M. (1987). *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8558-8562.
- Horváth, B., Bachem, C. W. B., Schell, J., Kondorosi, Á. (1987). Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant signal, interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J.* **6**, 841-848.
- Jording, D., Uhde, C., Schmidt, R., Pühler, A. (1994). The C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport system of *Rhizobium meliloti* and its role in nitrogen fixation during symbiosis with alfalfa (*Medicago sativa*). *Experientia* **50**, 874-883.
- Kannenberg, E. L., Brewin, N. J. (1994). Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. *Trends Microbiol.* **278**, 277-283.
- Keller, M., Roxlau, A., Weng, W. M., Schmidt, M., Quandt, J., Niehaus, K., Jording, D., Arnold, W., Pühler, A. (1995). Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 267-277.
- Kijne, J. W. (1992). The *Rhizobium* infection process. In *Biological Nitrogen fixation*, G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans, eds (New York: Chapman and Hall), pp.349-398.

- Kiss, G. B., Vincze, E., Kalman, Zs., Forrai, T., Kondorosi, A. (1979). Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*. J. Gen. Microbiol. **113**, 105-111.
- Knauf, V. C., Nester, E. W. (1982). Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of *Agrobacterium* Ti plasmid. Plasmid **8**, 45-54.
- Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Kondorosi, A. (1984). Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. Mol. Gen. Genet. **193**, 445-452.
- Kondorosi, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buiré, M., Hoffmann, B., Schell, J., Kondorosi, A. (1991a). Identification of NodR, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. J. Mol. Biol. **222**, 885-896.
- Kondorosi, E., Buire, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffmann, B., Kondorosi, A. (1991b). Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in nod gene activation and in optimal nodulation of the plant host. Mol. Microbiol. **5**, 3035-3048.
- Köplin, R., Wang, G., Hotte, B., Priefer, U., Pühler, A. (1993). A 3.9 kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of dTDP-rhamnose. J. Bacteriol. **175**, 7786-7792.
- Krey, R., Pühler, A., Klipp, W. (1992). A defined amino acid exchange close to the putative nucleotide binding site is responsible for an oxygen-tolerant variant of the *Rhizobium meliloti* NifA protein. Mol. Gen. Genet. **234**, 433-441.
- Leigh, J. A., Signer, E. R., Walker, G. C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Proc. Natl Acad. Sci. USA **82**, 6231-6235.
- Leigh, J. A., Reed, J. W., Hanks, J. F., Hirsch, A. M., Walker, G. C. (1987). *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their Calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. Cell **51**, 579-587.
- Leigh, J. A., Lee, C. C. (1988). Characterization of polysaccharides of *Rhizobium meliloti* *exo* mutants that form ineffective nodules. J. Bacteriol. **170**, 3327-3332.
- Leigh, J. A., Coplin, D. L. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. Annu. Rev. Microbiol. **46**, 307-346.

- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C., Denarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. **344**, 781-784.
- Long, S., McCune, S., Walker, G. C. (1988a). Symbiotic loci of *Rhizobium meliloti* identified by random *TnphoA* mutagenesis. *J. Bacteriol.* **170**, 4257-4265.
- Long, S., Reed, J. W., Himawan, J., Walker, G. C. (1988b). Genetic analysis of a cluster of genes required for synthesis of the calcofluor-binding exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **170**, 4239-4248.
- Maillet, F., Debellé, F., Denarié, J. (1990). Role of the *nodD3* and *syrM* genes in the activation of the regulatory gene *nodD3*, and of the common and host-specific *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **4**, 1975-1984.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Marsolier, M. C., Carragol, E., Hirel, B. (1993). Multiple functions of promoter sequences involved in organ specific expression and ammonia regulation of a cytosolic soybean glutamine synthetase gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant J.* **3**, 405-414.
- Martinez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 113-140.
- Miao, G. H., Hirel, B., Marsolier, M. C., Ridge, R. W., Verma, D. P. S. (1991). Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Cell* **3**, 11-22.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, R. W., McRae, D. G., Al-Jobore, A., Berndt, W. B. (1988). Respiration supported nitrogenase activity of isolated *Rhizobium meliloti* bacteroids. *J. Cell. Biochem.* **38**, 35-49.
- Miller, S. S., Driscoll, B. T., Gregerson, R. G., Gantt, J. S., Vance, C. P. (1998). Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *The Plant J.* **15**, 173-184.

- Morona, R., van den Bosch, L., Manning, P. A. (1995). Molecular, genetic and topological characterization of O-antigen chain length regulation in *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. 177, 1059-1068.
- Mulligan, J. T., Long, S. R. (1985). Induction of *Rhizobium meliloti* *nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6609-6613.
- Mulligan, J. T., Long, S. R. (1989). A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Genetics 122, 7-18.
- Müller, P., Keller, M., Weng, W. M., Quandt, J., Arnold, W., Pühler, A. (1993). Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoYFQ* operon - ExoY is homologous to sugar transferases and ExoQ represents a transmembrane protein. Mol. Plant Microbe Interact. 6, 55-65.
- Noonan, B., Motherway, M., O'Gara, F. (1992). Ammonia regulation of the *Rhizobium meliloti* nitrogenase structural and regulatory genes under free-living conditions: involvement of the *fixL* gene product. Mol. Gen. Genet. 234, 423-428.
- Oláh, B., Borzi, J., Kiss, E., Györgypál, Z., Kondorosi, Á., Dusha, I. (2000). Connection of the nitrogen and carbon metabolism of alfalfa nodules induced by the *ntrR* mutant *S. meliloti* strain. Plant Cell – beküldve
- Ozga, D. A., Lara, J. C., Leigh, J. A. (1994). The regulation of exopolysaccharide production is important at two levels of nodule development in *Rhizobium meliloti*. Mol. Plant Microbe Interact. 7, 758-765.
- Pathirana, S. M., Vance, C. P., Miller, S. S., Gantt, J. S. (1992). Alfalfa root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: characterization of the cDNA and expression in effective and plant-controlled ineffective nodules. Plant Mol. Biol. 20, 437-450.
- Rastogi, V., Labes, M., Finan, T., Watson, R. (1992). Overexpression of the *dctA* gene in *Rhizobium meliloti*: effect on transport of C<sub>4</sub>-dicarboxylates and symbiotic nitrogen fixation. Can. J. Microbiol. 38, 555-562.
- Reed, J. W., Capage, M., Walker, G. C. (1991a). *Rhizobium meliloti* *exoG* and *exoJ* mutations affect the ExoX-ExoY system for modulation of exopolysaccharide production. J. Bacteriol. 173, 3788
- Reed, J. W., Glazebrook, J., Walker, G. C. (1991b). The *exoR* gene of *Rhizobium meliloti* affects RNA levels of other *exo* genes but lacks homology to known transcriptional regulators. J. Bacteriol. 173, 3789-3794.



- Reed, J. W., Walker, G. C. (1991). The *exoD* gene of *Rhizobium meliloti* encodes a novel function needed for alfalfa nodule invasion. *J. Bacteriol.* **173**, 664-677.
- Reuber, T. L., Long, S., Walker, G. C. (1991). Regulation of *Rhizobium meliloti* *exo* genes in free-living cells and in planta examined by using *TnphoA* fusions. *J. Bacteriol.* **173**, 426-434.
- Reuber, T. L., Walker, G. C. (1993a). Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* **74**, 269-280.
- Reuber, T. L., Walker, G. C. (1993b). The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **175**, 3653-3655.
- Reuhs, B. L., Williams, M. N. V., Kim, J. S., Carlson, R. W., Cote, F. (1995). Suppression of the Fix<sup>-</sup> phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutant by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J. Bacteriol.* **177**, 4289-4296.
- Reyrat, J. M., David, M., Blonski, C., Boistard, P., Batut, J. (1993). *J. Bacteriol.* **175**, 6867-6872.
- Rostás, K., Kondorosi, É., Horváth, B., Simoncsits, A., Kondorosi, Á. (1986). Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1757-1761.
- Sasakawa, C., Yoshikawa, M. (1987). A series of Tn5 variants with various drug-resistance markers and suicide vector for transposon mutagenesis. *Gene*. **56**, 283-288.
- Savouré, A., Magyar, Z., Pierre, M., Brown, S., Schultze, M., Dudits, D., Kondorosi, Á., Kondorosi, É. (1994). Activation of the cell-cycle machinery, and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago* microcallus suspension. *EMBO J.* **13**, 1093-1102.
- Schultze, M., Kondorosi, É., Ratet, P., Buiré, M., Kondorosi, A. (1994). Cell and molecular biology of *Rhizobium*-Plant interactions. *Int. Rev. Cytol.* **156**, 1-76.
- Schulze, J., Adgo, E., Schilling, G. (1994). The influence of N<sub>2</sub>-fixation on the carbon balance of leguminous plants. *Experientia* **50**, 906-912.
- Sharypova, L. A., Yurgel, S. N., Keller, M., Simarov, B. V., Pühler, A., Becker, A. (1999). The *eff-482* locus of *Sinorhizobium meliloti* CXM1-105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglycanase, a

- transcriptional regulator and an adenylate cyclase. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 1032-1044.
- Shaw, V. K., Brill, W. J. (1977).** Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* **74**, 3249-3253.
- Soberon, M., Williams, H. D., Poole, R. K., Escamilla, E. (1989).** Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **171**, 465-472.
- Stanford, A. C., Larsen, K., Barker, D. G., Cullimore, J. V. (1993).** Differential expression within the glutamine synthetase gene family of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **103**, 73-81.
- Szeto, W. W., Nixon, B. T., Ronson, C. W., Ausubel, F. M. (1987).** Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.* **169**, 1423-1432.
- Swanson, J. A., Mulligan, J. T., Long, S. R. (1993).** Regulation of *symM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics* **134**, 435-444.
- Temple, S. J., Heard, J., Ganter, G., Dunn, K., Sengupta-Gopalan, C. (1995).** Characterization of a nodule-enhanced glutamine synthetase from alfalfa: nucleotide sequence, in situ localization and transcript analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 218-227.
- Temple, S. J., Bagga, S., Sengupta-Gopalan, C. (1998)** Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant Mol. Biol.* **37**, 535-547.
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., De Billy, F., Promé, J. C., Dénarié, J. (1991).** Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**, 670-673.
- Tyerman, S. D., Whikhead, L. F., Day, D. A. (1995).** A channel-like transporter for  $\text{NH}_4^+$  on the symbiotic interface of  $\text{N}_2$ -fixing plants. *Nature* **378**, 629-632.
- Udvardi, M. K., Day, D. A. (1997).** Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 493-523.
- Urzainqui, A., Walker, G. C. (1992).** Exogenous suppression of the symbiotic deficiencies of *Rhizobium meliloti exo* mutants. *J. Bacteriol.* **174**, 3403-3406.

- Vance, C. P., Stade, S., Maxwell, C. A. (1983). Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. *Plant Physiol.* **72**, 469-473.
- Vance, C. P. (1991). Carbon in N<sub>2</sub> fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **42**, 373-92.
- Vance, C. P., Gregerson, R. G., Robinson, D. L., Miller, S. S., Gantt, J. S. (1994). Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci.* **101**, 51-64
- Vance, C. P., Miller, S. S., Gregerson, R. G., Samac, D. A., Robinson, D. L., Gantt, J. S. (1995). Alfalfa NADH-dependent glutamate synthase: structure of the gene and importance in symbiotic N<sub>2</sub> fixation. *Plant J.* **8**, 345-358.
- Walker, E. L., Coruzzi, G. M. (1989). Developmentally regulated expression of the gene family for cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* **91**, 702-708.
- Witty, J. F., Minchin, F. R., Skot, L., Sheely, J. E. (1986). Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Plant Cell Biol.* **3**, 275-315.
- Yanish-Perron, C., Vieira, C., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- York, G. M., Walker, G. C. (1997). The *Rhizobium meliloti* *exoK* gene and *prsD/prsE/exsH* genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of low-molecular-weight succinoglycan. *Mol. Microbiol.* **25**, 117- 134.
- York, G. M., Walker, G. C. (1998). The succinyl and acetyl modifications of succinoglycan influence susceptibility of succinoglycan to cleavage by the *Rhizobium meliloti* glycanases ExoK and ExsH. *J. Bacteriol.* **180**, 4184-4191.
- Zhan, H., Levery, S. B., Lee, C. C., Leigh, J. A. (1989). A second exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain SU47 that can function in root nodule invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3055-3059.
- Zhan, H., Leigh, J. A. (1990). Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **172**, 5254-5259.
- Zhan, H., Lee, C. C., Leigh, J. A. (1991). Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J. Bacteriol.* **173**, 7391-7394.